



UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

CAMPILOBACTERIOSE GENITAL EM TOUROS MANTIDOS EM EXTENSIVO NO
ALENTEJO

Rita Daniela Cartaxo Sousa

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutora Luísa Maria Freire Leal Mateus
Doutor José Ricardo Dias Bexiga
Dr. José Miguel Leal da Costa

ORIENTADOR

Dr. José Miguel Leal da Costa

CO-ORIENTADOR

Doutor Luís Filipe Lopes da Costa

2014

LISBOA



UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

CAMPILOBACTERIOSE GENITAL EM TOUROS MANTIDOS EM EXTENSIVO NO
ALENTEJO

Rita Daniela Cartaxo Sousa

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutora Luísa Maria Freire Leal Mateus
Doutor José Ricardo Dias Bexiga
Dr. José Miguel Leal da Costa

ORIENTADOR

Dr. José Miguel Leal da Costa

CO-ORIENTADOR

Doutor Luís Filipe Lopes da Costa

2014

LISBOA

Para a minha família

AGRADECIMENTOS

Ao **Professor Doutor Luís Lopes da Costa**, pela orientação científica da minha dissertação de mestrado, pela sua total disponibilidade, paciência e conhecimentos transmitidos. O seu apoio foi fundamental para a conclusão deste trabalho, e por isso, o meu Muito Obrigado!

Ao **Dr. José Miguel Leal da Costa**, pela oportunidade que me concedeu ao aceitar orientar o meu estágio curricular, por toda a sua dedicação, conhecimentos transmitidos e opiniões partilhadas.

À **Dr.ª Sónia Germano**, pelo fornecimento de registos para execução deste trabalho e transmissão de novos pontos de vista.

À equipa do **Hospital Veterinário Muralha de Évora** por sete meses de aprendizagem, amizade e crescimento tanto profissional como pessoal.

À **Professora Doutora Ana Duarte**, por toda a simpatia, apoio e colaboração na componente laboratorial que foi imprescindível na execução desta dissertação.

Ao **Professor Doutor Telmo Nunes**, pela ajuda concedida na análise estatística dos dados, conselhos e atenção dispensada.

Ao **Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal (CIISA)** pelo apoio financeiro e disponibilização dos meios analíticos necessários para realização desta dissertação.

Agradeço ainda, a todas as pessoas que contribuíram de uma ou outra forma para a minha formação académica, a todos os meus amigos e colegas, pela amizade e apoio, bem como, por todos os momentos de boa disposição.

Por último, agradeço à minha família, pelo apoio incondicional, paciência e carinho.

CAMPILOBACTERIOSE GENITAL EM TOUROS MANTIDOS EM EXTENSIVO NO ALENTEJO

RESUMO

A Campilobacteriose Genital Bovina (CGB) é considerada mundialmente como uma das principais causas responsáveis pela infertilidade de bovinos de carne criados sob regime extensivo. O agente etiológico é o *Campylobacter fetus* subespécie *venerealis* (Cfv), uma bactéria altamente adaptada ao aparelho genital bovino, transmitida durante a cobrição por touros portadores (hospedeiro reservatório da doença), e que provoca sucessivas mortes embrionárias na fêmea bovina, redução das taxas de gestação e aumento dos dias de intervalo entre partos.

A aplicação dos novos métodos moleculares disponíveis para a pesquisa do agente Cfv, permitiu determinar a prevalência da CGB em amostras prepuciais de touros presentes na região do Alentejo. Recolheram-se amostras prepuciais de 29 touros, e a prevalência de touros infetados por Cfv foi de 20,7% (IC 95%: 0,098 – 0,384). Ao nível da prevalência por exploração, 4 em 10 explorações detiveram pelo menos um touro positivo (40%; IC 95%: 0,168 – 0,687). Assim, podemos concluir que a CGB pode certamente contribuir para a redução dos índices de produtividade das explorações de bovinos de carne no nosso país, sendo necessário estudar a dinâmica epidemiológica desta doença, elaborar medidas de prevenção e controlo, e aferir o impacto económico que representa para a rentabilidade e viabilidade da bovinicultura de carne nacional.

Palavras-chave: Campilobacteriose Genital Bovina; Infertilidade; Bovinos de carne; Métodos moleculares; Alentejo.

GENITAL CAMPYLOBACTERIOSIS IN BULLS UNDER EXTENSIVE FARMING CONDITIONS IN ALENTEJO

ABSTRACT

Bovine Genital Campylobacteriosis (BGC) is regarded worldwide as one of the main causes responsible for infertility in beef cattle raised under extensive farming conditions. The aetiological agent is *Campylobacter fetus* subspecies *venerealis* (*Cfv*), a bacteria highly adapted to the bovine genital tract, transmitted during service by carrier bulls (reservoir host), which causes successive embryonic deaths in females, reducing pregnancy rates and increasing the calving interval.

The application of the new molecular methods available for identification of *Cfv*, allowed to determine the prevalence of BGC in preputial samples from bulls present in the Alentejo region. Preputial samples were collected from 29 bulls, and the prevalence of infected bulls with *Cfv* was 20.7% (95% CI: 0.098 – 0.384). Of the 10 farms analysed, 4 had at least one infected bull (40%; 95% CI: 0.168 – 0.687). Therefore, we can conclude that the BGC can certainly help to promote low levels of animal productivity in beef cattle farms in our country. It is necessary to study the epidemiological dynamics of this disease, develop prevention and control measures, and assess to the economic impact on profitability and viability of the national beef herds.

Keywords: Bovine Genital Campylobacteriosis; Infertility; Beef cattle; Molecular methods; Alentejo.

ÍNDICE

DEDICATÓRIA.....	i
AGRADECIMENTOS.....	ii
RESUMO.....	iii
ABSTRACT	iv
ÍNDICE	v
Índice de figuras	vi
Índice de tabelas.....	vi
Índice de gráficos.....	vi
Lista de abreviaturas.....	vii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVO.....	2
3. RELATÓRIO DE ESTÁGIO	3
3.1. <i>Duração e breve descrição do local de estágio.....</i>	3
3.2. <i>Descrição das atividades desenvolvidas.....</i>	3
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	7
4.1. <i>Fatores que contribuem para a eficiência reprodutiva de vacadas em extensivo.....</i>	8
4.2. <i>Doenças venéreas e o papel do touro na sua disseminação</i>	12
4.3. <i>Relevância do exame andrológico no despiste de doenças venéreas</i>	15
4.4. <i>Campilobacteriose Genital Bovina</i>	17
4.4.1. <i>Etiologia.....</i>	17
4.4.2. <i>Taxonomia.....</i>	17
4.4.3. <i>Distribuição Geográfica</i>	19
4.4.4. <i>Fisiopatologia</i>	20
4.4.5. <i>Manifestação clínica</i>	21
4.4.6. <i>Diagnóstico clínico.....</i>	23
4.4.7. <i>Técnicas de Diagnóstico.....</i>	23
4.4.8. <i>Controlo e tratamento</i>	27
5. TRABALHO EXPERIMENTAL	31
5.1. <i>Material e métodos</i>	31
5.1.1. <i>Escolha das explorações e inquéritos realizados.....</i>	31
5.1.2. <i>Exames andrológicos</i>	33
5.1.3. <i>Métodos de diagnósticos da Campilobacteriose Genital Bovina</i>	34
5.1.4. <i>Análise estatística.....</i>	39
5.2. <i>Resultados</i>	40
5.2.1. <i>Caracterização e localização geográfica das explorações</i>	40
5.2.2. <i>Caracterização dos touros submetidos a recolha de amostra prepucial.....</i>	42
5.2.3. <i>CGB: resultados do teste de Imunofluorescência Direta</i>	43
5.2.4. <i>CGB: resultados do teste de PCR quantitativo</i>	44
5.2.5. <i>CGB: hipotéticos fatores de risco e sua relação com a infeção por</i> <i>Campylobacter fetus subespécie venerealis</i>	47
5.2.6. <i>CGB: resultados do exame andrológico dos touros infetados com</i> <i>Campylobacter fetus subespécie venerealis</i>	47
5.3. <i>Discussão.....</i>	48
6. CONCLUSÃO	54
7. BIBLIOGRAFIA.....	55
8. ANEXOS.....	60

Índice de figuras

Figura 1. Distribuição geográfica da Campilobacteriose Genital Bovina entre Janeiro e Junho de 2013 (Fonte: WAHID, 2014).....	19
Figura 2. Distribuição geográfica da Campilobacteriose Genital Bovina na Europa Ocidental entre Janeiro e Junho de 2013 (Fonte: WAHID, 2014).....	20
Figura 3. Localização geográfica das explorações testadas por Imunofluorescência Direta (n=25).....	40
Figura 4. Distribuição relativa da raça dos touros cujas amostras prepuciais foram testadas por Imunofluorescência Direta (n=118).	42
Figura 5. Caracterização da idade dos touros cujas amostras prepuciais foram testadas por Imunofluorescência Direta (n=118).	42
Figura 6. Sequenciação da região <i>parA</i> das 6 amostras positivas a <i>Campylobacter fetus</i> subespécie <i>venerealis</i>	46
Figura 7. Electroforese horizontal em gel de agarose com GelRed dos produtos amplificados por PCR convencional	46

Índice de tabelas

Tabela 1. Casuística dos serviços veterinários prestados por exploração.....	4
Tabela 2. Casuística da atividade clínica prestada por animal.	5
Tabela 3. Características bioquímicas de diferentes espécies de <i>Campylobacter</i> , potencialmente isoladas a partir da mucosa genital bovina e respectivas doenças associadas (adaptado de Wagenaar, 2008 e Mshelia et al., 2010).	19
Tabela 4. Prevalência de espécies de <i>Campylobacter</i> em amostras de bovinos.	25
Tabela 5. <i>Primers</i> e sonda TaqMan® marcada no extremo 3' com <i>quencher</i> MGB.	38
Tabela 6. <i>Primers</i> desenvolvidos por Hum et al. (1997) e utilizados no PCR convencional. .	38
Tabela 7. Caracterização das explorações em estudo.....	41
Tabela 8. Resultados obtidos por Imunofluorescência Direta por animal.	43
Tabela 9. Resultados obtidos por Imunofluorescência Direta por exploração.	43
Tabela 10. Resultados obtidos por qPCR por animal.	44
Tabela 11. Resultados obtidos por qPCR por exploração.	44
Tabela 12. Quantificação do DNA alvo presente nas 6 amostras positivas a <i>Campylobacter fetus</i> subespécie <i>venerealis</i>	44
Tabela 13. Hipotéticos fatores de risco e sua relação com a infeção por <i>Campylobacter fetus</i> subespécie <i>venerealis</i>	47
Tabela 14. Resultados dos exames andrológicos de 4 touros testados positivos à Campilobacteriose Genital Bovina.	47

Índice de gráficos

Gráfico 1. Representação da reação de qPCR com curvas <i>standard</i> do controlo positivo <i>Campylobacter fetus</i> subespécie <i>venerealis</i> (DSM18826).	37
Gráfico 2. Representação da curva do controlo negativo resultante da reação de qPCR.....	37
Gráfico 3. Representação da reação de qPCR com 4 amostras positivas. Cada amostra corrida em duplicado (por ordem crescente de Ct: touros nº 72, 47, 87 e 50).	45

Lista de abreviaturas

ACL – Associação Portuguesa de Criadores da Raça Bovina Limousine
ADS – Associação de Defesa Sanitária
AFLP – “*Amplified Fragment Length Polymorphism*”
BLAST – “*Basic Local Alignment Search Tool*”
BVD – Diarreia Viral Bovina
CC – Condição Corporal
Cfv – *Campylobacter fetus* subespécie *venerealis*
Cff – *Campylobacter fetus* subespécie *fetus*
CGB – Campilobacteriose Genital Bovina
CN – Cabeças normais
Ct – “*Cycle threshold*”
CVB – Campilobacteriose Venérea Bovina
DNA – “*Deoxyribonucleic Acid*”
dNTP – “*Deoxynucleotide Triphosphates*”
EA – Exame Andrológico
ELISA – “*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*”
HVME – Hospital Veterinário Muralha de Évora
IA – Inseminação Artificial
IBR – Rinotraqueíte Infeciosa Bovina
IC – Intervalo de confiança
IEP – Intervalo entre partos
IFD – Imunofluorescência Direta
INE – Instituto Nacional de Estatística
IPC – Intervalo parto-concepção
MGB – “*Minor Groove Binder*”
MPR – Movimentos progressivos retilíneos
OIE – “*Office International des Epizooties*”
OPP – Organização de Produtores Pecuários
pb – Pares de base
PCR – “*Polymerase Chain Reaction*”
PFGE – “*Pulsed Field Gel Electrophoresis*”
qPCR – PCR quantitativo
PBS – “*Phosphate Buffered Saline*”
RT-PCR – “*Real Time – Polymerase Chain Reaction*”
RTS – “*Reproductive Tract Scoring*”
TB – Tricomoníose Bovina
UFC – Unidades formadoras de colónias
WAHID – “*World Animal Health Information Database*”

1. INTRODUÇÃO

A produção de bovinos de carne em Portugal (vacas aleitantes) representa 29% do efetivo bovino nacional, com cerca de 441 000 animais distribuídos pela quase totalidade do país (Instituto Nacional de Estatística [INE], 2012). De acordo com as Estatísticas Agrícolas de 2011, a região do Alentejo corresponde à área com a maior concentração de bovinos explorados em linha materna acolhendo aproximadamente 71% do efetivo bovino aleitante (INE, 2012). Apesar da expressão do sector bovino na atividade agrícola regional e em particular no Alentejo, é pois surpreendente o grande número de explorações cuja produtividade se mantém muito aquém do que se poderia *a priori* considerar como ideal (Bettencourt & Carolino, 2008).

O sector praticamente não exporta, mas não será por isso que não precisará de crescer (Roquete, 2008). Com as margens de lucro cada vez mais pequenas torna-se indispensável ao criador ter em atenção todos os fatores que possam influenciar a produtividade de uma vacada no sentido de maximizá-la (Villa Nova, 2010).

O sucesso de uma exploração bovina depende diretamente da sua eficiência reprodutiva, da taxa de crescimento dos seus bezerros (até à sua venda ou uso para reprodução) e da eficiência na conversão de alimentos (Preto, 2010). Um dos aspetos que mais limita a eficiência reprodutiva de um efetivo é a incidência de doenças infecciosas com impacto na reprodução. Vários agentes infecciosos podem ser responsáveis por reduzir taxas de ovulação, taxas de conceção, produzir mortes embrionárias ou situações de aborto, e ainda o nascimento de bezerros fracos (Givens, 2006).

Apesar da implementação de programas de erradicação de doenças infectocontagiosas ter contribuído significativamente para a alteração do padrão de infertilidade infecciosa em bovinos nas últimas décadas, este mesmo controlo continua presentemente incompleto em muitas explorações de bovinos de carne em regime extensivo.

A Campilobacteriose Genital Bovina e Tricomoníase Bovina, também designadas por doenças venéreas clássicas são consideradas mundialmente como duas das principais causas responsáveis pela infertilidade de bovinos criados extensivamente. Capazes de promover elevadas perdas económicas devido às falhas reprodutivas que originam, os respetivos agentes, a bactéria *Campylobacter fetus* subespécie *venerealis* e o protozoário *Tritrichomonas foetus*, existem em Portugal e há indicação de poder haver bastantes explorações contaminadas embora a sua prevalência seja desconhecida (Robalo Silva & Lopes da Costa, 2010). É neste contexto que se insere a presente dissertação que teve como principal objetivo estudar a prevalência da Campilobacteriose Genital Bovina naquela que é a região que detém a maior fração do efetivo bovino com aptidão para carne no país, o Alentejo.

2. OBJETIVO

O trabalho experimental que se apresenta desenvolveu-se no âmbito do estágio curricular do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa.

A sua realização teve como principal objetivo determinar a prevalência da Campilobacteriose Genital Bovina em amostras prepuciais de touros presentes na região do Alentejo, e investigar a aplicação de metodologias moleculares na pesquisa do agente *Campylobacter fetus* subespécie *venerealis* através da reação de polimerização em cadeia em tempo real (“*Real Time – Polymerase Chain Reaction*” [RT – PCR]), também designada por PCR quantitativo (qPCR). Simultaneamente, foi possível avaliar o desempenho da técnica de Imunofluorescência Direta (IFD) enquanto prova de *screening* para um rastreio inicial de *Campylobacter spp.*.

3. RELATÓRIO DE ESTÁGIO

3.1. Duração e breve descrição do local de estágio

O estágio curricular que possibilitou a realização do trabalho experimental decorreu no Hospital Veterinário Muralha de Évora (HVME), na área da sanidade e clínica de espécies pecuárias, sob a orientação do Dr. José Miguel Leal da Costa, no período de 4 de Setembro de 2012 a 8 de Abril de 2013, apresentando a duração total de sete meses.

O HVME, e em particular o Departamento de Animais de Produção, devido ao elevado leque de serviços que é capaz de prestar aos criadores, caracteriza-se por um distinto dinamismo que proporciona ao estagiário aprendizagem e participação em diferentes atividades relacionadas com a área, entre elas: consultas em regime ambulatorio, profilaxia médica e sanitária, e intervenções do centro de reprodução. Foi no centro de reprodução que se desenvolveu a maior parte deste estágio.

Quanto à atividade ligada ao saneamento animal, o HVME trabalha com seis Associações de Defesa Sanitária/Organização de Produtores Pecuários (ADS/OPP), nomeadamente a COPRAPEC (Montemor-o-Novo), a ACOS (Beja), a ACORE (Estremoz), a ACORPSOR (Ponte de Sôr), o ADS de Mourão e Reguengos de Monsaraz, e o ADS de Coruche e Salvaterra de Magos, abrangendo uma considerável área de aproximadamente 11500 km².

3.2. Descrição das atividades desenvolvidas

Para além das atividades inerentes ao tema em estudo, tais como o exame andrológico, a recolha de amostras prepuciais e o trabalho laboratorial, foi também possível observar e realizar outro tipo de tarefas que não estavam relacionadas com esse tema. As Tabelas 1 e 2 separam a casuística observada durante o período de estágio diferenciando o número de serviços prestados por exploração e a atividade clínica verificada por animal.

Tabela 1. Casuística dos serviços veterinários prestados por exploração.

Serviços (por exploração)		Número de casos observados	Frequência Relativa (%)
Saneamento			
	Bovinos	14	13,2
	Pequenos ruminantes	3	2,8
Profilaxia			
	Bovinos	5	4,7
	Pequenos ruminantes	4	3,8
	Suínos	1	0,9
	Cães	3	2,8
Teste de pré-movimentação			
		8	7,5
Identificação eletrônica			
	Pequenos ruminantes	6	5,7
	Cães	4	3,8
Reprodução e obstetrícia			
Diagnóstico de gestação			
	Bovinos	18	17
	Pequenos ruminantes	4	3,8
Exame andrológico			
	Bovinos	22	20,8
	Pequenos ruminantes	1	0,9
Sincronização de cios			
	Bovinos	5	4,7
	Pequenos ruminantes	1	0,9
Inseminação artificial			
	Bovinos	7	6,6
Total		106	100

Tabela 2. Casuística da atividade clínica prestada por animal.

Consultas (por animal)		Número de casos observados	Frequência Relativa (%)
Bovinos			
Gerais			
	Vaca caída	6	3,8
	Abcessos/feridas	5	3,1
	Outros	3	1,9
Aparelho reprodutor			
	Partos	17	10,7
	Prolapso vaginal/uterino	8	5,0
	Retenção placentária	3	1,9
	Cesariana	1	0,6
	Piômetra/endometrite	4	2,5
	Quistos ovários	8	5,0
Aparelho músculo-esquelético e locomotor			
	Claudicação	3	1,9
	Corte de unhas	1	0,6
Aparelho respiratório			
	Broncopneumonia	6	3,8
Aparelho gastrointestinal			
	Timpanismo	3	1,9
	Impactação ruminal	2	1,3
	Retículo peritonite traumática	2	1,3
	Diarreia	16	10,1
Oftamologia			
	Queratoconjuntivite	8	5,0
Doenças infecciosas			
	Actinobacilose	3	1,9
	Leptospirose	2	1,3

Tabela 2. (continuação)			
	Papilomatose	1	0,6
	Tinha	1	0,6
	Mamites	2	1,3
Doenças parasitárias			
	Piroplasmose	7	4,4
	Besnoitiose	1	0,6
Toxicologia			
		4	2,5
Necrópsia			
		14	8,8
Pequenos ruminantes			
Aparelho reprodutor			
	Partos distócicos	4	2,5
Necrópsia			
		6	3,8
Suínos			
Aparelho reprodutor			
	Castração	6	3,8
Doenças infecciosas			
	Mal Rubro	5	3,1
Necrópsia			
		1	0,6
Aves de Capoeira			
Necrópsia			
		2	1,3
Cães			
Gerais			
		4	2,5
Total		159	100

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1. Fatores que contribuem para a eficiência reprodutiva de vacadas em extensivo

O número de vitelos produzidos por vaca e por ano é um dos fatores com maior impacto na eficiência biológica e económica de um efetivo bovino explorado para a produção de carne (Bettencourt & Carolino, 2008). Face às exigências do mercado e economia competitiva em que vivemos, é fundamental encorajar os criadores do sector bovino a implementar técnicas de controlo reprodutivo que lhes permitam identificar as causas que ocasionam redução da eficiência (re)produtiva de modo a otimizar as características do produto final, isto é, a quantidade e qualidade de vitelos que se consegue obter por ano.

A rentabilização económica da exploração encontra-se assim diretamente relacionada com a gestão da fertilidade do efetivo, por sua vez sujeita às condições de manejo, genótipo, nutrição e sanidade (Lopes da Costa, Leitão Alegre & Morais Gradil, 1990).

O conceito “fertilidade” pode ser definido como a capacidade da fêmea bovina exercer com eficácia a função reprodutiva (Matos, 2009), sendo que na prática este desempenho traduz-se pelo número de vacas capazes de parir num intervalo de tempo convencionado. O estabelecimento de um elevado grau de eficiência reprodutiva ocorre quando a fêmea bovina tem ciclos reprodutivos anuais, isto é, um parto a cada 365 dias, com beneficiação fecundante logo após a entrada do touro na vacada e um mínimo de dias sem estar reprodutivamente funcional (Roquete, 2008).

Para se conseguir o que se pretende, é necessário programação (Cortes, 2010), pelo que a análise dos registos reprodutivos é fundamental para que se consiga fazer previsões realistas, as quais podem ser utilizadas como base de decisões de natureza técnica e económica (Lopes da Costa, 2008).

Os parâmetros mais utilizados para avaliar a produtividade individual e da exploração estão diretamente relacionados com a eficiência reprodutiva, os quais são:

- a) Idade ao primeiro parto: é o índice produtivo que representa numa dada população o potencial genético para a idade à puberdade, mas que na realidade acaba por refletir principalmente o manejo nutricional das novilhas (Rocha & Carvalheira, 2002). Uma menor idade ao primeiro parto pressupõe uma maior vida produtiva. Idealmente, as novilhas de substituição devem apresentar o primeiro parto aos 24 meses de idade (sobretudo se se tratarem de genótipos sexualmente mais precoces), sendo necessário um regime alimentar rigoroso que lhes permita alcançar com 12 – 14 meses o peso ideal à cobrição (65% do peso corporal de adulta) (Fanning, Selph & Eubanks, 2012). Para garantir que o criador coloca à cobrição apenas as novilhas aptas a ciclar deve ser utilizado ainda um método adicional de seleção, baseado na maturidade dos ovários e desenvolvimento dos cornos uterinos que funciona como indicador de maturidade sexual (“Reproductive Tract Scoring” [RTS]) (Andersen, LeFever, Brinks & Odde, 1991).

- Distócias: a probabilidade de ocorrerem partos distócicos na jovem novilha será maior. Além da idade, peso vivo e/ou condição corporal, as novilhas postas à reprodução devem ser avaliadas também quanto à conformação da zona pélvica (Fanning, Selph & Eubanks, 2012).
- b) Época do parto: o maior desafio do sistema de manejo reprodutivo em bovinos de carne é ajustar as disponibilidades alimentares aos pontos críticos do ciclo reprodutivo (Lopes da Costa, 2011). Períodos de carência alimentar reduzem a eficácia da capacidade reprodutiva pós-parto, pois reconhece-se que determinadas fases do ciclo reprodutivo, tais como o último terço da fase de gestação, o parto e o período de fecundação e estabelecimento de nova gestação (2 meses pós-parto), não podem ocorrer quando o alimento está menos disponível (Lopes da Costa, 2011). É necessário estudar o ciclo de produção forrageira local, conciliando o pico da produção dos prados com a calendarização da época de parição. A determinação do período em que ocorre a concentração dos partos pressupõe o estabelecimento de épocas de reprodução definidas.
- Época de reprodução definida: é considerada como uma das medidas de manejo mais rentáveis que um bovinicultor pode adotar, constituindo o primeiro passo para o incremento da eficiência e/ou produtividade ponderal de quilos desmamados/vaca (Troxel, 2011; Roquete, 2008). Esta garante uma melhor gestão do manejo reprodutivo do efetivo, pois permite um aumento da sobrevivência neonatal e até ao desmame dos vitelos, o manejo da vacada e vitelos por lotes, a introdução de tecnologias reprodutivas e a realização das intervenções sanitárias no momento ideal do ciclo reprodutivo (Lopes da Costa, 2008). A duração da época de cobrição irá depender do grau de dispersão das partições antes de se iniciar o programa de controlo reprodutivo, mas numa primeira fase pode variar entre os 3 a 6 meses (Lopes da Costa, 2008). Posteriormente, para que se consiga concentrar os partos em 2 – 4 meses, a meta a atingir será a cobrição total da vacada num período que não pode ir além dos 3 meses (Bento, 2006).
- c) Parto: na vaca aleitante a condição corporal (CC) no momento do parto é o principal condicionante do intervalo de tempo necessário para o restabelecimento da atividade ovárica pós-parto, e consequentemente pela duração do anestro pós-parto (Randel, 1990; citado por Lopes da Costa, 2008). A duração do anestro pós-parto é um fator limitante para alcançar um ótimo rendimento reprodutivo, pois restringe a obtenção de ciclos reprodutivos anuais (Riera, 2013; Lopes da Costa, 2008). Uma fêmea com CC inferior ao parto irá apresentar uma maior dificuldade de reposição de reservas

corporais (prioritariamente terá que responder à involução do aparelho reprodutivo e às necessidades de lactação), e deste modo, impossibilita-a de ser coberta e ficar gestante após a entrada do touro na vacada (Roquete, 2008).

É necessário controlar a CC da vacada pelo menos em dois pontos críticos do ciclo reprodutivo, nomeadamente no início da época de cobrição (mínimo de 2,75 – 3,25, numa escala 1 – 5) e antes da época de partos (mínimo 3,0 – 3,5) para que o atraso à concepção seja o menor possível na época reprodutiva seguinte.

- d) Intervalo entre partos (IEP): o IEP é dividido em duas fases, o período de gestação e o intervalo parto-concepção (IPC). O período de gestação é semelhante nas diferentes raças bovinas com uma duração média de 282 a 285 dias. O IPC compreende o intervalo de tempo entre parto e o estabelecimento de uma nova gestação com uma variação entre os 30 e os 170 dias (Ball & Peters, 2004; Anderson, Burris, Johns & Bullock, 2002). Para obter um parto a cada 365 dias, o IPC não deve ser superior a 80-85 dias. Isto implica a rápida recuperação da fertilidade pós-parto e explica a importância dos períodos de cobrição curtos (2 – 3 meses). Lembra-se que a taxa de concepção correlaciona-se positivamente com a CC e por isso, uma CC média alta no início da época de reprodução assegura uma boa fertilidade. A manutenção do IPC ótimo depende ainda do diagnóstico precoce da gestação que permite evitar continuar a alimentar fêmeas vazias, e ajuda a decidir mais cedo quais os animais a eliminar, ou a selecionar para “repescagem” numa segunda época de reprodução.
- e) Taxa de refugo: a taxa de refugo total deverá situar-se entre os 15 e 25% (Bento, 2006). Quanto menor for a taxa de refugo por motivos reprodutivos maior é a margem reservada para refugos com base na produção, o chamado refugo voluntário. A percentagem de vacas sujeitas ao refugo voluntário depende dos objetivos de seleção preestabelecidos pelo criador.
- f) Encabeçamento: traduz-se pelo número médio de cabeças normais (CN¹) que cada unidade de superfície forrageira (hectare) consegue suportar ao longo do ano. Encabeçamentos demasiado elevados conduzem a situações de sobrepastoreio, e consequentemente comprometem a eficiência reprodutiva da vacada ao diminuir a disponibilidade alimentar que os animais encontram à sua volta, conduzindo à diminuição da CC e reservas energéticas usadas para suportar a função reprodutiva. De modo a manter o pastoreio compatível com a capacidade forrageira da pastagem,

¹ 1,0 CN = Touros, vacas e outros bovinos com mais de 2 anos.

0,6 CN = Bovinos de 6 meses a 2 anos.

0,4 CN = Bovinos com menos de 6 meses.

encabeçamento nos sistemas extensivos não deve ser superior a 1,4 CN por hectare de superfície agrícola útil (Decreto-Lei nº 202/2005).

- g) Fertilidade do touro: a escolha do touro pode contribuir também para um IEP reduzido através da seleção de animais com elevada fertilidade (Catita, 2013). Em bovinos de carne, a importância da comprovação da aptidão reprodutiva é incontestável. Afinal, trata-se dum sistema produtivo em que a rentabilidade económica depende indiretamente do número de fêmeas que ficam gestantes. Uma das maiores vantagens em realizar o exame reprodutivo do macho prende-se com a identificação de touros ditos sub-férteis (Bettencourt & Romão, 2009) ou touros portadores de doenças infecciosas com repercussão na reprodução, ambos responsáveis por níveis de fertilidade reduzidos e período de cobrições e partos alargados. O exame de função reprodutiva do touro deve ser realizado 60 dias antes da época reprodutiva de forma a garantir-se sempre a substituição atempada de touros inaptos por machos certificados e aprovados para cobrição (Fanning, Selph & Eubanks, 2012).
- Rácio macho/fêmea: salienta-se ainda, a adequada relação macho-fêmea de forma a obter o maior número de fêmeas gestantes no final da época de cobrição. As recomendações gerais são 15 a 20 vacas para touros jovens, enquanto para touros adultos será possível chegar-se às 50 vacas por touro, consoante a disponibilidade de alimento, CC e resultado do exame andrológico (Associação Portuguesa de Criadores da Raça Bovina Limousine [ACL], 2010).
- h) Controlo sanitário da exploração: em primeiro lugar, o controlo sanitário de um efetivo bovino encontra-se sujeito à harmonização legislativa referente ao combate das prdoenças infectocontagiosas que vigoram nos planos de erradicação/vigilância nacional de saúde animal, sendo elas: a Brucelose, a Tuberculose e a Leucose Enzoótica Bovina. O objetivo consiste em adquirir um elevado estatuto sanitário no país que confira crescimento económico ao sector, e a garantia da proteção de valores tais como a saúde pública, bem-estar animal e proteção do ambiente. Para além da classificação sanitária, a exploração deve apresentar ainda planos profiláticos de acordo com as suas especificidades. Ou seja, programas de vacinação e desparasitação adequados à localização geográfica e condições climáticas, presença de outras espécies, existência de outras explorações por perto, manejo geral da exploração, entre outros (Villa Nova, 2010). Sob o âmbito da eficiência reprodutiva, podem ser utilizados esquemas de vacinação contra doenças reprodutivas como a Leptospirose, a Rinotraqueíte Infecciosa bovina (IBR) e o vírus da Diarreia Viral bovina (BVD) contribuindo assim para uma melhor proteção da fertilidade da vacada.

4.2. Doenças venéreas e o papel do touro na sua disseminação

No panorama da bovinicultura de carne em regime extensivo, o touro de monta natural constitui um fator de extrema importância para a eficiência reprodutiva de uma exploração. Nestes sistemas, a cobertura natural permanece como método reprodutivo predominante, de modo que os touros reprodutores representam não só um elevado investimento em património genético como também são os responsáveis diretos pela produção de vitelos (e consequentemente por quilos de carne) (Silva, 2012).

Apesar de constituírem uma pequena percentagem do total do efetivo, individualmente nenhum outro animal apresenta o mesmo impacto para a economia de uma exploração que o touro, pois atenda-se ao seguinte: para além de contribuir com 50% da genética de um bezerro, um único touro adulto é encarregue de cobrir entre 40 a 50 vacas. Ora, se o macho reprodutor não conseguir cumprir com sua função na vacada, isto é, cobrir com eficiência, rapidamente o número de vitelos diminui e a rentabilidade económica da exploração fica em risco.

Na preparação para a época de cobertura é preciso que o criador se certifique que o animal que selecionou está em perfeitas condições de contribuir com todo o seu potencial reprodutivo. A comprovação da aptidão reprodutiva torna-se assim essencial de forma a evitar que animais com problemas de fertilidade sejam utilizados, registando-se elementos objetivos tais como as características físicas do reprodutor (integridade dos órgãos genitais inclusive) e a qualidade do ejaculado (Robalo Silva & Lopes da Costa, 2010).

Embora a motivação subjacente ao exame de função reprodutiva prender-se normalmente com o desejo em obter informação sobre a capacidade de produção de espermatozóides férteis, outros componentes devem ser igualmente pesquisados dado a sua direta correlação com a fertilidade do efetivo. Isto é, a eleição de reprodutores não deve basear-se apenas no conceito de infertilidade, pois um touro pode ser fértil e no entanto comprometer a viabilidade desta fileira produtiva quando por exemplo, este é portador de agentes infecciosos capazes de condicionar as taxas de fertilidade.

A identificação de agentes infecciosos responsáveis por falhas reprodutivas constitui ainda hoje um enorme desafio para os sistemas extensivos, onde quebras de fertilidade são identificadas tardiamente e as alterações reprodutivas (tais como, repetição deaios, fetos abortados e restos placentários) são pouco perceptíveis de observar em animais criados a campo. De tal modo que, para reduzir-se o impacto que determinado agente patogénico possa ter na exploração, faz todo o sentido salientar a importância de uma monitorização sanitária, rigorosa e sistemática, à entrada de novos animais na exploração, assim como a todos os animais presentes na vacada.

O exame do touro inclui a pesquisa de doenças reprodutivas como por exemplo, a Brucelose, o IBR, o BVD, a Leptospirose e ainda as doenças de transmissão venérea Campilobacteriose Genital Bovina (CGB) e Tricomoniase Bovina (TB) (Robalo Silva & Lopes da Costa, 2010).

Aquando da seleção de um touro reprodutor, a recolha de material para a pesquisa da CGB e TB constitui provavelmente uma das provas complementares mais importantes para a salvaguarda da fertilidade do efetivo. As doenças de transmissão venérea caracterizam-se por produzir infecção assintomática nos machos, sendo o touro um dos principais fatores de risco para a propagação e manutenção de doenças venéreas na exploração (Irsik & Shearer, 2010).

Originalmente infetado pela presença de vacas portadoras, o macho constitui o principal veículo de transmissão dos agentes *Campylobacter fetus* subespécie *venerealis* e *Tritrichomonas foetus* (agentes etiológicos da CGB e TB, respetivamente). Estes agentes são transmitidos de forma passiva durante a cobrição, alojando-se na superfície do epitélio prepucial do touro, impedindo-o de montar uma resposta imunitária eficaz e conferindo-lhe assim a condição de portador assintomático. Por possuírem condições favoráveis ao crescimento dos dois microrganismos, touros mais idosos (acima dos 5 anos) apresentam conjuntamente maior probabilidade de se encontrarem contaminados pois têm mais pregas prepuciais onde os agentes se podem alojar (Robalo Silva & Lopes da Costa, 2010).

As principais consequências da introdução destes agentes no efetivo são as sucessivas perdas embrionárias que a fêmea bovina sofre após contaminação e que se traduzem no aumento do número deaios/cobrições por gestação, alargamento da época de partos, e dos dias de intervalo entre partos (Preto, 2013).

Em regime extensivo, estas alterações reprodutivas são muito pouco evidentes pois baseiam-se sobretudo na repetição deaios, sendo necessário um plano de observação e anotação diária do comportamento reprodutivo da vacada para controlar as vacas que são cobertas e que ao fim de 21 dias repetem o cio. A natureza subclínica da CGB e TB possibilita deste modo a disseminação dos agentes pela vacada sem que a sua presença seja inicialmente perceptível.

A redução de fertilidade no efetivo não é visível de imediato e a sua suspeita só se verifica depois de calculada a taxa de gestação ou durante a época de partos quando é observada uma grande dispersão de nascimentos (Walker & McKinnon, 2011; Robalo Silva & Lopes da Costa, 2010).

A velocidade da disseminação de CGB e TB pela vacada depende ainda do rácio macho/fêmea de cada exploração, sendo superior sempre que o número de touros colocados

à cobertura é excessivo, visto que rapidamente todos os machos serão contaminados por fêmeas repetidoras (Walker & McKinnon, 2011).

Até à eliminação dos agentes, as doenças venéreas estabelecem um período de infertilidade temporária na vaca que promove um elevado prejuízo económico para o sector, pois aumenta o número de dias durante os quais a fêmea é improdutiva e mais tarde, contribui para uma grande instabilidade na oferta de produto.

A Organização Internacional de Saúde Animal (*“Office International des Epizooties”* [OIE]) declara inclusivamente a CGB e a TB como doenças de notificação obrigatória ao comércio internacional de animais ou produtos de origem animal, sendo consideradas doenças transmissíveis com impacto socioeconómico e importância para a saúde pública.

Lamentavelmente, as doenças venéreas clássicas não possuem um programa de vacinação eficaz que permita reduzir a possibilidade de infeção. A vacinação é antes utilizada como complemento de uma política de eliminação dos animais infetados e talvez por isso não se encontrem disponíveis em Portugal vacinas para controlo da CGB e TB.

Assim, sempre que um criador observe um aumento do número deaios/cobrições por gestação, uma taxa de gestação reduzida e/ou alargamento da época de partos, principalmente depois da introdução de animais em idade reprodutiva, um diagnóstico laboratorial para despiste de doenças venéreas é altamente aconselhável.

4.3. Relevância do exame andrológico no despiste de doenças venéreas

Os sinais clínicos associados à CGB e TB embora indicativos não são exclusivamente característicos das doenças de transmissão venérea. Existem outras doenças reprodutivas, fatores ambientais ou de manejo que podem provocar quadros clínicos semelhantes (com repetição de cios, aborto e quebras de fertilidade), justificando a necessidade de um diagnóstico laboratorial para isolamento e identificação dos agentes na vacada.

A colheita de amostras pode ser realizada tanto em fêmeas como machos, e ainda fetos abortados que venham a ser identificados nos montados. No caso da fêmea bovina, a identificação dos agentes só é provável enquanto a vaca se encontrar contaminada, pois eventualmente esta virá a ser capaz de montar uma resposta imunitária e conseguir eliminar tais microrganismos. Mais uma vez a observação do comportamento reprodutivo do efetivo é essencial para que seja possível identificar fêmeas repetidoras, vacas que abortaram ou que apresentem algum corrimento vaginal, submetendo-as de seguida ao diagnóstico.

Após identificação destes animais, a amostra é então colhida através do método de raspagem e/ou aspiração de muco cervical, transferido consecutivamente para um meio de transporte adequado. Restos placentários e tecidos fetais, tais como pulmões, baço, fígado e conteúdo abomasal fornecem também boas hipóteses de isolamento de *Campylobacter fetus* subespécie *venerealis* e *Tritrichomonas foetus* (Wagenaar, 2008).

Como portador permanente, o touro é considerado o principal candidato para diagnóstico das doenças de transmissão venérea. O protocolo de diagnóstico consiste na recolha de material através da lavagem e/ou raspagem do fórnix prepucial, com posterior acondicionamento em meio apropriado e envio para laboratório (Robalo Silva J. & Lopes da Costa L., 2010).

A eficácia do diagnóstico aumenta se a recolha das amostras for efetuada depois de duas ou três semanas de repouso sexual, pois isso permite que a concentração dos agentes aumente nas pregas do prepúcio (Robalo Silva J. & Lopes da Costa L., 2010).

Compreende-se agora o quanto é pertinente a pesquisa dos agentes de transmissão venérea durante o exame andrológico. Ao conjugar a recolha das amostras com a data de realização do exame, cria-se uma oportunidade com a qual será possível impedir atempadamente a entrada de um touro portador de CGB e TB na vacada e com ele a respetiva transmissão de qualquer um dos agentes.

Outro aspeto a considerar, relaciona-se com os efetivos cronicamente infetados. Segundo Hum (2007), Walker e McKinnon (2011) são frequentemente observados valores na ordem dos 60 – 80 % de fertilidade depois do primeiro ano de contacto com o agente, o que contribui para que estas doenças permaneçam ocultas nos sistemas de produção. Assim, criadores que não detetaram sinais de CGB e/ou TB logo após a entrada do(s) agente(s) na vacada, podem vir a sofrer diminuição da produtividade a longo prazo sem o saberem. Por isso, se o criador pedir exames anuais de função reprodutiva dos touros já usados em épocas

reprodutivas anteriores, e se for feita a pesquisa de agentes infecciosos, rapidamente poderá ser feito o despiste à CGB e à TB. No caso de resultado positivo, e a exploração encontrar-se contaminada, medidas de controle poderão ser então instituídas, reduzindo-se mais um fator responsável por perdas produtivas.

Por último, deve-se realçar que a realização desta prova complementar certamente atribuirá maior crédito aos critérios de aprovação do exame andrológico, e conseqüentemente, do ponto de vista do criador será depositada uma maior confiança na respetiva metodologia, bem como na importância da sua realização para o aumento da eficiência reprodutiva.

4.4. Campilobacteriose Genital Bovina

A presente dissertação tem como principal objetivo estudar a prevalência da Campilobacteriose Genital Bovina (CGB), também conhecida como Campilobacteriose Venérea Bovina (CVB), que é uma doença sexualmente transmissível caracterizada por infertilidade, morte embrionária precoce e aborto em bovinos (Wagenaar, 2008).

O agente etiológico é o *Campylobacter fetus* subespécie *venerealis*, uma bactéria altamente adaptada ao aparelho genital bovino, podendo ser isolada a partir do smegma prepucial, muco vaginal ou se for o caso, órgãos internos de fetos abortados.

A espécie *Campylobacter fetus* divide-se em duas subespécies relativamente próximas: o *C. fetus* subespécie *venerealis* (*Cfv*) e o *C. fetus* subespécie *fetus* (*Cff*). A sua distinção baseia-se na interpretação de vários fatores, tais como o mecanismo de transmissão, apresentação clínica e características bioquímicas e/ou moleculares demonstradas laboratorialmente.

Encontra-se ainda descrito, o *Campylobacter fetus* subespécie *venerealis intermedius*, um serovar de alta patogenicidade (Wagenaar, 2008).

Ao contrário do *Cfv* que causa perdas económicas elevadas devido aos problemas de fertilidade que provoca, o *Cff* é associado a situações de aborto esporádico. Noakes, Parkinson e England (2001), referem inclusivamente que do conjunto da infertilidade causada por *Campylobacter fetus*, o *Cff* corresponde apenas a 10%. Este microrganismo é transmitido oralmente, encontrando-se no tubo digestivo de ovinos e bovinos (Mshelia, Amin, Woldehiwet, Murray & Egwu, 2010), sendo capaz de alcançar o útero gravídico por via hematogénea.

4.4.1. Etiologia

O *Campylobacter fetus* subespécie *venerealis* é um microrganismo extracelular móvel que apresenta a forma de um S, tratando-se de um bacilo fino (0,2 a 0,5 µm de comprimento), ligeiramente curvado, Gram negativo e com características microaerófilas. Esta bactéria apresenta uma forma helicoidal, distinguindo-se à microscopia eletrónica a presença de um flagelo com inserção polar numa ou em ambas extremidades (Yaeger & Hollery, 2007).

4.4.2. Taxonomia

Como referido em 4.4, a distinção entre as duas subespécies de *Campylobacter fetus*, é feita em laboratório tendo como base testes bioquímicos ou moleculares.

Para que se comparem parâmetros bioquímicos é necessário efetuar-se primeiro o isolamento e identificação do agente por cultura, técnica laboratorial que ainda hoje é considerada o *gold standard* para o diagnóstico de CGB. Porém, o crescimento fastidioso e requisitos nutricionais

e atmosféricos específicos do género *Campylobacter spp.* fazem da tarefa de isolamento um processo extremamente oneroso (Mshelia et al., 2010).

Estes microrganismos são na sua grande maioria microaerófilos, sendo necessário recriar uma atmosfera com 5 – 7% de oxigénio, 5 – 15% de dióxido de carbono e 65 – 90% de nitrogénio para otimizar o seu crescimento (Kiggins & Plastridge, 1956; citado por Mshelia et al., 2010). A temperatura ótima encontra-se entre 25° e 43° Celsius (°C), enquanto o pH favorável ao seu crescimento é entre 5.8 e 8.0 (Kelana & Griffiths, 2003)

Após o seu crescimento em meio seletivo, a distinção entre *Cfv* e *Cff* faz-se a partir do tradicional fenótipo bioquímico: teste de tolerância à glicina (Wagenaar, 2008).

Este teste é feito em duplicado através da incubação do agente em dois meios de cultura, possuindo um deles 1% de glicina na sua composição. O *Cff* por ser tolerante mantém o seu crescimento na presença de 1% de glicina, no entanto, o *Cfv* não tolerante apenas irá crescer na sua ausência.

A descrição de serovares de *Cfv* tolerantes à glicina (*Campylobacter fetus* subespécie *venerealis intermedius*) veio a demonstrar que a tolerância pode ser adquirida por transdução ou por mutação, e consequentemente a identificação das subespécies através de características fenotípicas deixou ser tão fiável como inicialmente se julgava (Hum, Quinn, Brunner & On, 1997).

Métodos moleculares constituíram assim uma alternativa aos métodos tradicionais. Além destas técnicas possuírem elevada sensibilidade e especificidade, o facto de permitirem a deteção de microrganismos não-viáveis permitiu ultrapassar um dos maiores obstáculos que o método bacteriológico possuía, visto que neste último a manutenção da viabilidade do microrganismo fora do hospedeiro até ao laboratório era essencial.

A Tabela 3 resume as espécies de *Campylobacter* que podem ser isoladas na mucosa genital bovina, os testes bioquímicos que as distinguem entre si e as respetivas doenças provocadas.

Tabela 3. Características bioquímicas de diferentes espécies de *Campylobacter*, potencialmente isoladas a partir da mucosa genital bovina e respectivas doenças associadas (adaptado de Wagenaar, 2008 e Mshelia et al., 2010).

	25°C	42°C	Oxidase	Catalase	NaCl 3,5%	Glicina 1%	H ₂ S	Ácido nalidixico	Cefalotina	Doenças associadas
<i>Campylobacter fetus</i> sub. <i>venerealis</i>	V	-	+	V	-	-	-	V	S	CGB
<i>Campylobacter fetus</i> sub. <i>fetus</i>	+	V	+	+	-	V	-	R	S	Aborto esporádico
<i>Campylobacter jejuni</i>	-	V	+	V	-	V	-	S	R	Aborto muito raramente
<i>Campylobacter hyointestinalis</i>	-	+	+	+	-	V	V	R	S	Diarreia
<i>Campylobacter sputorum</i> sub. <i>bubulus</i>	-	+	+	V	+	+	+	V	S	Comensal da flora genital bovina

(+) Reação/ crescimento positivo; (-) reação/crescimento negativo; (V) resultados variáveis; (S) sensível; (R) resistente

4.4.3. Distribuição Geográfica

A CGB é uma das principais causas de elevadas perdas económicas na bovinicultura enquanto fator limitante da produção animal. Estima-se que esta doença de carácter endémico exista predominantemente nos países em desenvolvimento em que o método de cobrição natural prevalece, com especial destaque para a produção de bovinos de carne em regime extensivo (Mshelia et al., 2012).

Segundo a OIE, a situação epidemiológica de vários países continua uma incógnita, mantendo-se a não publicação de casos e a carência de planos de vigilância. A Figura 1 demonstra a distribuição mundial da doença (CGB) no primeiro semestre de 2013 (“*World Animal Health Information Database*” [WAHID], 2014).

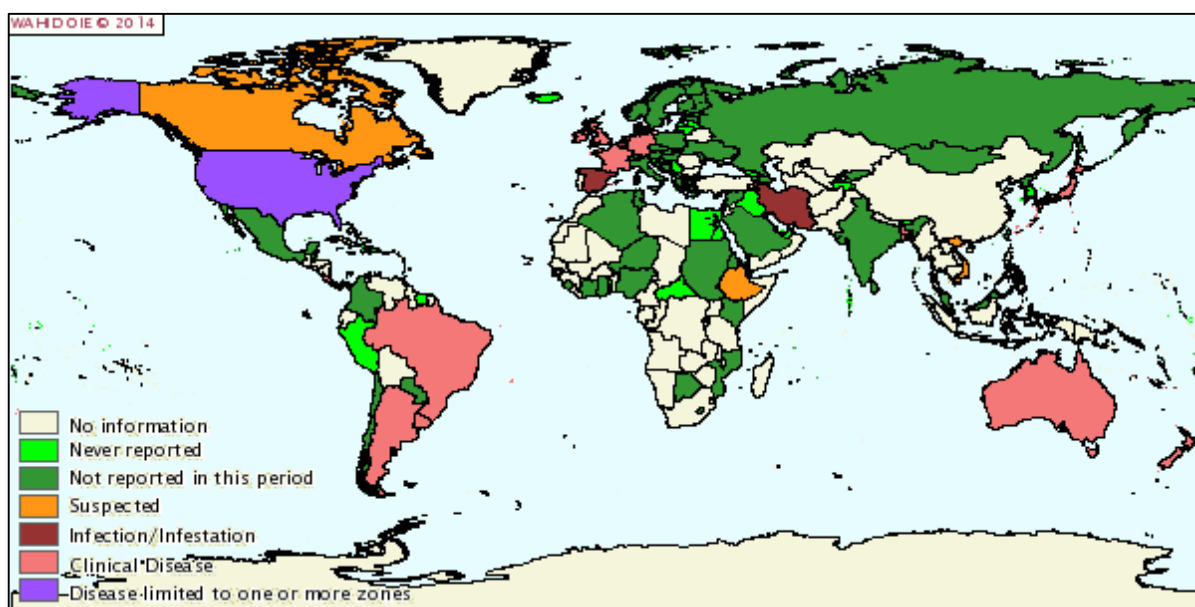


Figura 1. Distribuição geográfica da Campilobacteriose Genital Bovina entre Janeiro e Junho de 2013 (Fonte: WAHID, 2014).

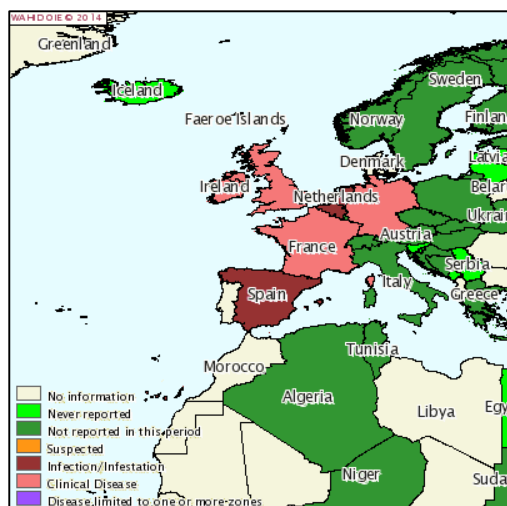


Figura 2. Distribuição geográfica da Campilobacteriose Genital Bovina na Europa Ocidental entre Janeiro e Junho de 2013 (Fonte: WAHID, 2014).

4.4.4. Fisiopatologia

Historicamente, a CGB é considerada uma das principais doenças transmitidas sexualmente (Yaeger & Hollery, 2007). Em bovinos de leite, o recurso à inseminação artificial permitiu diminuir rapidamente o número de animais afetados, sendo utilizado sêmen de touros certificados, livres de doenças infectocontagiosas.

O touro é considerado o principal hospedeiro e reservatório desta doença, pois atua como um vetor mecânico transmitindo-a no momento da cobrição (Noakes et al., 2001).

Nas vacadas de carne, em que este método de reprodução se mantém, a transmissão de *Cfv* continua a decorrer. Yaeger e Hollery (2007) referem inclusivamente que a taxa de transmissão de touros infetados a vacas suscetíveis pode atingir os 100%.

As características anatómicas do aparelho genital do touro reúnem as condições ideais para a colonização deste agente. A mucosa do pénis e prepúcio dos touros é revestida por epitélio escamoso estratificado, ligeiramente queratinizado, formando criptas que se estendem até à submucosa (Cobo, Corbeil & BonDurant, 2011). O *Cfv* aloja-se nessas criptas, onde o ambiente é microaerófilo, encontrando-se confinado à glândula peniana, parte distal da uretra e prepúcio.

Touros jovens com 3/4 anos de idade tornam-se portadores através do contacto sexual com fêmeas infetadas. Porém, a infeção nestes animais é transitória, pois ainda não apresentam pregas prepúciais suficientemente profundas que permitam ao agente persistir cronicamente. Com o tempo a superfície da mucosa dos touros mais velhos altera-se, ficando mais irregular e com mais pregas (Mshelia et al., 2012) tornando-os portadores crónicos.

A transmissão entre touros também é possível através de material de recolha de sêmen contaminado (Yaeger & Hollery, 2007).

Na fêmea bovina, o *Cfv* apresenta um elevado tropismo pelas células do endométrio (Jimenez, Perez, Carpenter & Martinez, 2011), o que resulta numa ligeira endometrite não diagnosticável por palpação transrectal, sendo raro observar corrimento mucopurulento (Noakes et al., 2001).

Após a cobertura estabelece-se uma infeção ascendente e em sensivelmente 12 a 14 dias, o microrganismo distribui-se desde a vagina/cérvix até aos cornos uterinos (Yaeger & Hollery, 2007). O *Cfv* não interfere com o processo de fertilização e jovem desenvolvimento embrionário, contudo as reações teciduais inflamatórias impedem a implantação do embrião (Noakes et al., 2001), seguindo-se a mortalidade embrionária precoce.

A manifestação clínica da doença depende do número de microrganismos a que o animal foi exposto e da velocidade de multiplicação bacteriana no útero. A rápida multiplicação ocorre frequentemente e num período entre 15 e 80 dias sucede-se a morte do embrião ou feto. Sempre que a morte embrionária decorre após o reconhecimento materno da gestação (dias 15 a 17) o retorno ao estro é mais tardio, mostrando-se irregular. Quando a multiplicação do agente é mais lenta, a gestação continua a decorrer até que o animal sofre aborto tardio (entre os 4 e 7 meses) devido a lesões placentárias e invasão bacteriana do feto. Estes animais constituem menos de 10% do total do efetivo.

À medida que o *Cfv* é eliminado dos cornos uterinos e corpo do útero, a fertilidade volta a restabelecer-se. Porém, a persistência deste microrganismo dura cerca de 3 a 6 meses, período durante o qual a vaca permanece infértil e fonte de infeção (Yaeger & Hollery, 2007).

Do mesmo modo que os touros se podem infetar com a utilização de material de recolha de sémen contaminado, as fêmeas podem também ser infetadas com o uso de instrumentos mal higienizados e desinfetados, nomeadamente material obstétrico (Yaeger & Hollery, 2007).

4.4.5. Manifestação clínica

A identificação da presença do agente na vacada é difícil, pois não há sinais de doença no touro e a vaca raramente mostra corrimento vaginal que existindo é ligeiro, também é difícil observar abortos pois a sua prevalência é baixa. Por norma, a sua suspeita só se verifica quando é observada uma grande dispersão de nascimentos e quebra de fertilidade sem outras causas aparentes, principalmente após a introdução de um novo touro na vacada (Robalo Silva & Lopes da Costa, 2010).

Em vacadas bem acompanhadas, verifica-se o aumento do número de vacas que retornam ao cio várias vezes devido às sucessivas mortes embrionárias precoces. As taxas de gestação

diminuem cerca de 40 – 70% e ao exame reprodutivo estes animais apresentam idades gestacionais bastante distintas. Em vacadas em que a infecção é endêmica, a diminuição da fertilidade não é tão visível, sendo mais facilmente observável em novilhas ou animais recentemente introduzidos (Yaeger & Hollery, 2007).

Vacas idosas e novilhas são os animais mais suscetíveis devido à baixa imunidade (Jimenez et al., 2011). A imunidade contra este microrganismo desenvolve-se lentamente e em média, após cinco cobrições a fêmea bovina consegue conceber e manter a gestação até ao final. Após o parto, uma pequena percentagem de fêmeas pode ainda apresentar retenção placentária como resultado da doença (Noakes et al., 2001).

Apesar da infecção por *Cfv* não ser tão persistente nas vacas como é nos touros (Cobo et al., 2011), encontra-se descrito que algumas fêmeas alojam o agente de uma época reprodutiva para a outra. Simultaneamente foi verificado que é possível isolar *Cfv* até 196 dias pós-parto, caso esta última gestação tenha resultado de uma concepção com sêmen infetado (Yaeger & Hollery, 2007).

Admite-se que a persistência de *Cfv* no aparelho genital bovino deve-se à capacidade deste microrganismo em evadir a resposta imunitária do hospedeiro. Cobo et al. (2011) refere como principal mecanismo responsável pela falha de imunidade as variações antigénicas das glicoproteínas de superfície do *Cfv*, que ao impedir a ligação de anticorpos impossibilitam a opsonização da bactéria e respetiva fagocitose.

Após infecção, a fêmea bovina desenvolve rapidamente imunidade local através da produção de anticorpos específicos contra as glicoproteínas de superfície do *Cfv*, as imunoglobulinas A (IgA). Apesar das IgA favorecerem a imobilização do *Cfv* através da sua aglutinação, estas possuem uma capacidade bactericida limitada, oferecendo uma proteção parcial. A infecção só é progressivamente eliminada quando anticorpos provenientes da resposta imunitária sistémica, as imunoglobulinas G (IgG), atingem o útero (Corbeil, Campero, Rhyhan & BonDurant, 2003).

Embora a maioria das fêmeas ganhe imunidade contra este agente e consiga prosseguir com a gestação, a imunidade é apenas temporária. O que significa que na gestação seguinte, se o agente ainda circular na manada, o ciclo repete-se, porém de forma menos severa, uma vez que ao segundo contacto já existe memória imunológica. Eventualmente, após 2 a 3 anos a fertilidade da vacada estabiliza deixando de ser visíveis perdas tão abruptas. A análise de dados irá demonstrar um nível aceitável de taxas de concepção e um número de saltos por concepção semelhante entre os animais em que já ocorreu contacto. Porém, sempre que forem introduzidos animais novos como por exemplo novilhas sensíveis à infecção, o problema perpetuar-se-á (Noakes et al., 2001).

4.4.6. Diagnóstico clínico

O diagnóstico é baseado na interpretação da história pregressa, manifestação clínica e identificação do agente em raspagens prepuciais, muco vaginal ou tecidos fetais.

Segundo o “Manual de Técnicas de Diagnóstico e Vacinas para Animais Terrestres” (Wagenaar, 2008), a identificação do agente poderá ser feita por isolamento em cultura, identificação imunológica ou identificação molecular.

Seguidamente são descritos os métodos de diagnóstico internacionalmente aceites para diagnóstico de Campilobacteriose Genital Bovina (CGB).

4.4.7. Técnicas de Diagnóstico

4.4.7.1. Isolamento e identificação do agente

Apesar dos desafios inerentes à cultura de *Cfv*, e supracitados em 4.4.2, o método bacteriológico mantém-se uma das técnicas laboratoriais mais utilizadas no diagnóstico da CGB.

A eleição de um meio de transporte enriquecido e um rápido transporte da amostra até ao laboratório são aspetos fundamentais ao isolamento do agente, pois permitem ultrapassar dois dos principais obstáculos que se impõe ao sucesso desta técnica, sendo eles: a reduzida viabilidade do microrganismo fora do hospedeiro e o crescimento de bactérias comensais contaminantes que dificultam a identificação de colónias de *Cfv* após cultura (Monke, Love, Wittum, Monke, Byrum, 2002; Mshelia et al., 2012).

Monke et al. (2002) demonstrou que para o isolamento de *Cfv* os meios de cultura capazes de conservar e promover o melhor crescimento do agente são o meio de transporte enriquecido de *Weybridge* e o meio de crescimento seletivo de *Skirrow*, cuja combinação de antibióticos foi a mais eficaz na inibição de contaminantes. Quanto ao tempo de transporte este não deve exceder as 24 horas, sendo o intervalo de tempo ideal inferior a 4 horas.

Após incubação da amostra em meio de crescimento seletivo, em atmosfera microaerófila durante 2 a 5 dias, a identificação das colónias de *Campylobacter spp.* é feita com recurso a testes bioquímicos, diferenciando-se o *Cfv* do *Cff* pelo teste de tolerância a 1% de glicina. Recorda-se a descrição de um serovar de *Cfv* tolerante à glicina, o *Campylobacter fetus* subespécie *venerealis intermedius*, que demonstra como a discriminação entre as duas subespécies de *Campylobacter fetus* não deve depender apenas de uma única característica (On & Harrington, 2001).

A análise bacteriológica trata-se portanto de uma técnica de diagnóstico de reduzida sensibilidade para identificação do agente da CGB, e consequentemente um único resultado negativo não é suficiente para considerar um animal livre de infeção (Irons, Schutte, Van Der Walt & Bishop, 2004).

4.4.7.2. Métodos imunológicos

4.4.7.2.1. Identificação de *Campylobacter fetus* por Imunofluorescência Direta

Em países como a Argentina e o Brasil, a técnica de Imunofluorescência Direta (IFD) popularizou-se como um método rápido e direto para a pesquisa de touros portadores (Laboratorio Azul Diagnóstico S.A., 2012; Figueiredo, Pellegrin, Fóscolo, Machado, Miranda, Lage, 2002).

Como previamente mencionado, o tempo de transporte das amostras para o laboratório é de extrema importância, o que faz com que métodos como a identificação por isolamento sejam pouco adaptados em regiões onde a distância entre o local de colheita da amostra e o laboratório é significativa (Schmidt, Venter & Picard, 2010).

Para a realização desta técnica, as amostras são diluídas diretamente em soluções tamponadas (“*phosphate-buffered saline*” [PBS]) com 1% de formol. O microrganismo é morto, não sendo necessário que este se mantenha viável até ao laboratório. Deste modo, parâmetros como o intervalo de tempo e o crescimento de bactérias contaminantes têm menor importância.

Em 2002, Figueiredo et al. conduziu um estudo que permitiu calcular o limite de detecção desta técnica, tendo sido encontrado valores como 10^4 UFC/ml para soluções tamponadas não centrifugadas após lavagem prepucial e 10^2 UFC/ml para soluções tamponadas centrifugadas. A técnica demonstrou ainda uma sensibilidade e especificidade de 92,59% e 88,89%, respetivamente.

É importante referir que a sensibilidade desta técnica depende ainda de dois fatores, nomeadamente a performance do técnico durante recolha de amostras e a frequência da mesma. A detecção de *Campylobacter fetus* só é possível quando existem um mínimo de 100 UFC/ml. Deste modo, é recomendado repetir a colheita a cada animal três vezes, com intervalos de 15 dias, de forma, a diminuir a probabilidade de se obterem falsos negativos (Pellegrin, Figueiredo, Leite & Lage, 2003).

A sua maior limitação consiste na impossibilidade em se distinguirem as duas subespécies de *Campylobacter fetus*, sendo uma ferramenta útil para numa fase inicial se identificarem vacadas suspeitas.

A disponibilidade de reagentes comerciais para realização desta técnica é bastante reduzida e a maioria dos soros colocados no mercado são policlonais, causando reações cruzadas com outras bactérias e resultados falsos positivos (Brooks, Robertson, Lutze-Wallace & Pfahler, 2002). A Tabela 4 mostra a prevalência de diferentes espécies de *Campylobacter* que podem estar presentes na flora prepucial de touros, as quais poderão ser alvo de reação cruzada.

Tabela 4. Prevalência de espécies de *Campylobacter* em amostras de bovinos.

Agente etiológico	Material amostrado	Método de diagnóstico	Prevalência (%)	Referências
<i>Campylobacter fetus</i> subespécie <i>venerealis</i>	Amostra prepucial	Isolamento p/ cultura qPCR	13,36 28,4	Mai et al., 2013 Heuer et al., 2010
<i>Campylobacter fetus</i> subespécie <i>fetus</i>	Amostra prepucial Fezes	Isolamento p/ cultura PCR convencional	3,03 2	Mai et al., 2013 Inglis et al., 2004
<i>Campylobacter sputorum</i> subespécie <i>bubulus</i>	Amostra prepucial	Isolamento p/ cultura	32,8	Ruckerbauer et al., 1974
<i>Campylobacter hyointestinalis</i>	Fezes	Isolamento p/ cultura PCR convencional	10,8 7,7	Hakkinen et al., 2007 Inglis et al., 2004
<i>Campylobacter jejuni</i>	Fezes	Isolamento p/ cultura qPCR PCR multiplex	19,5 13,4 37,7	Hakkinen et al., 2007 Inglis et al., 2004 Wesley et al., 2000
<i>Campylobacter coli</i>	Fezes	Isolamento p/ cultura PCR multiplex	2,2 1,8	Hakkinen et al., 2007 Wesley et al., 2000

Uma vez que o *Cfv* e o *Cff* diferem tanto quanto à sua epidemiologia como importância clínica, os testes fenotípicos tradicionais e técnicas moleculares mantêm-se indispensáveis para a sua caracterização (Schulze, Bagon, Müller & Hotzel, 2006).

A IFD para além da sua utilização em amostras prepuciais pode ser aplicada também em amostras de muco vaginal e em tecidos ou conteúdos abomasais de fetos abortados. Neste último, a IFD poderá ser uma boa alternativa ao isolamento por cultura, sempre que o feto se apresente autolisado, visto nestas situações a probabilidade de isolamento bacteriano é muito reduzida (Campero et al., 2005).

4.4.7.2.2. Diagnóstico por métodos serológicos

A técnica de ELISA (“Enzyme-linked Immunosorbent Assay” [ELISA]) surge como uma ferramenta que permite fundamentalmente quantificar a resposta imunitária de um grupo de animais (Wagenaar, 2008). É um método de diagnóstico indireto, o que significa que ao invés de detetar o microrganismo, deteta anticorpos específicos, as imunoglobulinas A (IgA) e G (IgG) (McMillen et al., 2006).

Inicialmente Hum, Stephens e Quinn (1991) procuraram utilizar a técnica de ELISA com objetivo de detetar IgA na mucosa vaginal de vacas que tivessem abortado recentemente sob suspeitas de CGB. Porém, estes vieram a constatar o aparecimento de reações cruzadas com outras espécies de *Campylobacter* e a persistência destes anticorpos até 10 meses após a infeção. Trata-se de uma técnica que funciona melhor enquanto indicador de exposição, não sendo apropriada ao diagnóstico clínico individual (McMillen et al., 2006).

No touro a técnica foi igualmente inadequada ao diagnóstico de CGB, devido ao baixo título de anticorpos encontrados nas amostras prepuciais.

No geral, testes serológicos possuem pouco valor para o diagnóstico de CGB. Contudo, para avaliar a eficácia vacinal contra a CGB, este método poderá ser útil uma vez que permite

quantificar a resposta humoral de vacadas, ou seja, a concentração de IgG após o estímulo antigénico.

4.4.7.3. Métodos moleculares

4.4.7.3.1. PCR quantitativo (qPCR)

Foram propostos vários métodos moleculares no sentido de criar um procedimento alternativo que ultrapassasse as limitações que a bacteriologia possuía à correta e inequívoca identificação do agente *Cfv*, tais como a electroforese em campo pulsado ("*Pulsed Field Gel Electrophoresis*" [PFGE]), o polimorfismo do tamanho de fragmentos amplificados ("*Amplified Fragment Length Polymorphism*" [AFLP]) e a reação de polimerização em cadeia ("*Polymerase Chain Reaction*" [PCR]), entre outros (Wagenaar, 2008).

A generalidade destas técnicas não oferece a hipótese de um diagnóstico laboratorial rápido e rotineiro à CGB, pois são laboriosas e demoradas, e muitas requerem o prévio isolamento do *Cfv* para posterior identificação molecular (Chaban, Chu, Hendrick, Waldner & Hill, 2012). Atualmente, a reação de polimerização em cadeia em tempo real ("*Real Time – Polymerase Chain Reaction*" [RT – PCR]) constitui o método mais promissor à pesquisa de *Cfv* diretamente a partir das amostras biológicas, sendo capaz de detetar uma única célula de *Cfv* a partir de smegma prepucial ou muco cervical. Comparativamente, o PCR convencional deteta entre 10 a 100 células e o método de cultura entre 2500 a 25 000 células (McMillen et al., 2006).

O PCR em tempo real é mais expedito que o PCR convencional, pois não é necessário recorrer à análise por electroforese, oferecendo ainda uma maior sensibilidade e especificidade devido à utilização de sondas marcadas com fluorescência (TaqMan®). Este teste oferece também a oportunidade de quantificar a amostra, já que a fluorescência emitida permite estimar com precisão o número de células (McMillen et al., 2006).

Hum et al. (1997) descreveu o PCR original que contribuiu para o desenvolvimento desta técnica por McMillen et al. (2006). O PCR de Hum é constituído por 2 conjuntos de oligonucleotídeos ("*primers*"), o Mg3F/Mg4R e o VenSF/VenSR. O primeiro amplifica um fragmento com 750 a 960 pares de bases (pb), que só se encontra no *Campylobacter fetus* referente ao "*carbon starvation protein gene*", e o segundo um fragmento com 142 pb encontrado no *Cfv*, relativo ao gene *parA*. Este último gene localiza-se numa "*genomic island*" do *Cfv*, sendo até à data detetado apenas nesta subespécie.

A diferenciação entre as duas subespécies do *Campylobacter fetus* é feita então, com base na observação dos fragmentos isolados por electroforese. Enquanto o *Cfv* exhibe duas bandas com peso molecular de 142 pb e 960 pb, respetivamente, o *Cff* apresenta uma única banda de 960 pb.

O *primer* VenSF/VenSR de Hum foi testado extensivamente e demonstrou grande consistência em relação a metodologias alternativas, mas continuava a impossibilitar a análise direta de amostras (Chaban et al., 2012). McMillen et al. (2006) superou essa barreira quando

desenhou os primeiros *primers* e sonda TaqMan® adaptados à sequência genética contida no gene *parA*, adequando assim a técnica de PCR em tempo real à identificação de *Cfv*.

4.4.8. Controlo e tratamento

O controlo da CGB baseia-se nos pressupostos epidemiológicos: modo de transmissão da doença, identificação de animais portadores, evolução da doença no touro e na vaca após infeção; e aplicação integrada das medidas profiláticas e curativas existentes (Yaeger & Hollery, 2007).

A implementação de um programa de inseminação artificial (IA) é considerado o primeiro passo para o controlo da CGB numa exploração. O seu objetivo é bloquear a transmissão venérea da doença e impedir que animais não infetados sejam contaminados, enquanto animais infetados recuperam a imunidade (Noakes et al., 2001; Alves, Stynen, Miranda & Lage, 2011). Simultaneamente procede-se à eliminação da fonte de infeção crónica, isto é, refugam-se os touros portadores desta doença.

Apesar de aparentemente simples, o programa de controlo e erradicação da CGB possui dificuldades práticas muito elevadas. A IA em efetivos que se encontram sob regime extensivo é uma atividade muito dispendiosa devido não só às dificuldades técnicas, pois implicam a utilização de programas de sincronização deaios, como também pela disponibilização de recursos humanos necessários para uma boa gestão do efetivo (Alves et al., 2011).

A abordagem ao controlo da doença irá depender do próprio maneio da exploração. Uma vez diagnosticada a doença, vacadas que não se encontrem separadas por lotes constituem um grupo de animais expostos cujo estado de saúde é desconhecido.

Caso exista flexibilidade, aconselha-se a separação do efetivo reprodutor feminino em dois grupos, o grupo dos animais gestantes (grupo 1) e o grupo dos animais não gestantes (grupo 2).

O grupo 1 é imediatamente separado do resto do efetivo e uma vez que algumas fêmeas persistem infetadas de uma época reprodutiva para a outra, para que a estratégia de erradicação resulte é aconselhado recorrer à IA na época reprodutiva seguinte garantindo-se a eliminação do agente da exploração.

A razão pela qual não é vantajoso colocar na época reprodutiva seguinte um novo touro livre de doenças infectocontagiosas, deve-se ao facto do animal poder contrair o agente a partir da fêmea bovina e com o tempo tornar-se portador crónico (Noakes et al., 2001).

Ao grupo 2 poderão ser apresentas três alternativas: refugo dos animais não gestantes; manter touros portadores com as fêmeas até que estas sejam capazes de manter uma gestação, eliminando-se os machos no final da época reprodutiva; realizar um descanso sexual de 3 a 4 ciclos éstricos até à eliminação do agente e recuperação da imunidade, com posterior IA (Alves et al., 2011).

O refugo de um número de animais muito elevado não se torna viável para um criador. Daí a segunda e terceira alternativas sejam mais equilibradas. Caso se opte pelo descanso sexual, a sua principal vantagem será a de aproximar a época de cobrição/inseminação após aquisição da imunidade por parte das fêmeas, pois manter um touro a tempo inteiro significa que à medida que as fêmeas ultrapassem a infeção e o touro as cobre, as idades gestacionais resultantes serão muito díspares entre si.

Novamente, no ano seguinte as fêmeas que parirem deverão ser preferivelmente inseminadas para não correr o risco de infetar um touro livre de doença.

Em suma, é imperativo refugar os touros portadores no final de cada época reprodutiva e lembrar para que este esquema funcione a separação deve ser absoluta (Noakes et al., 2001).

Se as vacadas estiverem distribuídas por lotes é crucial conhecer se os touros utilizados em cada um dos lotes são positivos ou negativos à doença. Se forem negativos, vamos ter um grupo de animais não exposto e portanto, será imediatamente separado. Neste grupo podemos manter o touro livre de doença. Em todos os lotes que apresentem touros positivos, repete-se o esquema já referido.

A formação de um novo efetivo bovino a partir de novilhas e touros virgens, livres de doenças sexualmente transmissíveis, poderá constituir também uma alternativa em explorações onde é impossível realizar a estratégia mencionada. Contudo, será necessário a separação total e permanente dos novos animais.

Para que parte do efetivo se mantenha livre de doença enumeram-se os seguintes cuidados: evitar ter a vacada toda junta, distribuindo-a em grupos; evitar a entrada de touros adultos na exploração sem terem sido devidamente testados para doenças sexualmente transmissíveis; evitar a entrada de animais acidentalmente, mantendo as vedações em boas condições; restringir a substituição de animais a novilhas e touros novos; testar todos os machos reprodutores 6 a 8 semanas antes do início da época de reprodução; e refugar os machos positivos (Yaeger & Hollery, 2007).

A vacinação é também utilizada no plano de controlo da CGB, sendo considerada um meio complementar do programa de IA e uma mais-valia nas vacadas onde não é possível

introduzir outra forma de controlo da doença (Fósculo, Pellegrin, Stylen, Carneiro & Lage, 2007). Fora de Portugal existem vacinas comerciais disponíveis e que contribuem para a diminuição dos efeitos provocados pelo agente *Cfv*, por exemplo, a Vibrin® (Laboratórios Zoetis, Estados Unidos da América e África do Sul), a TriVib 5L® e a TrichGuard V5L® (Laboratórios MSD, Estados Unidos da América e Canadá), e ainda a Bovisan Total Se® (Laboratórios CEVA, Brasil).

Apesar da aplicação de vacinas comerciais ter sido discutida ao longo dos anos por vários autores devido à sua eficácia (Vasquez, Ball, Bennett, Rupp, Ellis, Olson & Huffman, 1983; Cobo, Cipolla, Morsella, Cano & Campero, 2003; Corbeil, Campero, Rhyen & BonDurant, 2003), a generalidade das fêmeas vacinadas demonstram melhoria da eficiência reprodutiva ao resistir ou eliminar rapidamente o agente patogénico com o aumento das taxas de gestação e diminuição do número de mortalidades embrionárias e abortos causados por *Cfv* (Fósculo et al., 2007; Cobo, Morsella, Cano, Cipolla & Campero, 2004).

Cobo et al. (2004) evidenciou ainda que vacinas comerciais não estimulam o mesmo nível de proteção imunitária que as autovacinas ou vacinas de rebanho, produzidas em laboratório, são capazes de promover. Tendo sido estabelecido que para aumentar a eficácia da vacina é necessário otimizar os seguintes fatores: concentração de antigénio por dose, estirpe de *Cfv* utilizada e adjuvante escolhido para incorporar a vacina (Cobo, 2004; Cobo, 2003; Jimenez et al., 2011).

Para que a vacina utilizada seja capaz de oferecer um bom nível de proteção, recomenda-se: 40 mg de peso seco de bactéria *Cfv* por dose (Wagenaar, 2008); recurso a estirpes bacterianas regionais na sua composição, e óleo mineral como adjuvante ao invés de hidróxido de alumínio, pois o primeiro é capaz de conferir uma estimulação mais elevada e prolongada de anticorpos apesar de associado ao aparecimento de granulomas no local da administração (Cobo, 2003; Jimenez et al., 2011).

Em touros, a eficácia da vacinação também não é unânime com resultados que variam entre os 56% (Fósculo et al., 2007) e os 100% (Bouters, De Keyser, Vandeplassche, Van Aert, Brone & Bonte, 1973), o que significa que embora seja eficaz na prevenção e cura da infeção na generalidade dos touros positivos à doença, esta não pode ser a única medida utilizada na estratégia do controlo da doença (Vasquez et al., 1983).

Quanto ao esquema vacinal, a primovacinação é feita a todo o efetivo reprodutor através da administração da primeira e segunda dose, 60 e 30 dias antes da época reprodutiva, respetivamente (Alves et. al, 2011). Uma vez que os touros podem tornar-se portadores crónicos, estes devem ser sempre vacinados anualmente com duas doses, de forma a garantir um efeito curativo.

No ano seguinte, vacinam-se novamente os touros e as fêmeas de substituição. A partir do terceiro ano, passam-se a vacinar apenas os touros (Wagenaar, 2008).

Em explorações livres de doença e como método preventivo, poder-se-á proceder à vacinação anual dos touros, 30 dias antes da época de reprodução, com 21 dias de intervalo entre as duas doses (Wagenaar, 2008).

Em animais com elevado valor genético a hipótese de tratamento poderá ser considerada. Na fêmea bovina, a utilização de antibióticos quer parenterais quer locais, não apresentou qualquer benefício (Noakes et al., 2001). No touro a utilização de dihidroestreptomicina pode alcançar bons resultados através da administração do antibiótico, de forma subcutânea na dose de 22 a 25 mg/Kg e respetiva administração tópica sob pomada de 5 g dihidroestreptomicina, no pénis e prepúcio (Noakes et al., 2001; Alves et al., 2011). Em alternativa, uma pomada de vaselina com 10 g de neomicina e 4 g de eritromicina também poderá ser usada no pénis e prepúcio (Noakes et al., 2001; Yaeger & Hollery, 2007).

5. TRABALHO EXPERIMENTAL

5.1. Material e métodos

5.1.1. Escolha das explorações e inquéritos realizados

O trabalho experimental resultou do acompanhamento das atividades do Hospital Veterinário Muralha de Évora (HVME), procurando conciliar a oportunidade de realização de consultas ambulatoriais, intervenções sanitárias e ações do centro de reprodução, tais como exames andrológicos ou atos de manejo reprodutivo, com a recolha de amostras prepuciais de touros da região e posterior análise para pesquisa da Campilobacteriose Genital Bovina (CGB).

Foi elaborado um inquérito epidemiológico para identificação dos principais fatores que interferem com a distribuição da CGB. Este incluía as seguintes perguntas:

- 1) Anamnese da exploração
 - a) Existência de explorações vizinhas
 - b) Entrada de animais na exploração acidentalmente
 - c) Troca ou cedência de touros
 - d) Período de quarentena após aquisição de animais
 - e) Efetivo total
 - i. Número de vacas adultas
 - ii. Número de touros
 - iii. Número de novilhas
- 2) Maneio da exploração
 - a) Existência de lotes e respetiva organização
- 3) Saneamento
 - a) Data do último saneamento
 - b) Classificação sanitária
 - c) Profilaxia utilizada
 - d) Desparasitação
 - e) Histórico de doenças reprodutivas
- 4) Parâmetros reprodutivos
 - a) Época de cobrição
 - i. Número
 - ii. Utilização de touros em regime de alternância
- 5) Método reprodutivo
 - a) Tipo de método reprodutivo
- 6) Efetivo reprodutor
 - a) Número de partos por ano
 - b) Idade média à 1ª cobrição
 - c) Idade média ao 1º parto

- d) Idade média do touro à 1ª cobrição
 - e) Idade média do touro que cobre as novilhas
 - f) Intervalo entre partos
 - g) Distribuição dos partos (quinzena/mês)
- 7) Diagnóstico de gestação
- a) Existência de diagnósticos de gestação
 - b) Tipo de diagnóstico de gestação
- 8) Taxas reprodutivas
- a) Fertilidade anual
 - b) Refugo (por causa reprodutiva)
 - c) Abortos
 - d) Retenção placentária
 - e) Endometrites/metrites
 - f) Piómetras
 - g) Repetição de cios
- 9) Observações

Adicionalmente, foi criada uma ficha para os touros presentes na exploração onde se pretendeu reunir a seguinte informação:

- 1) Animais
- a) Número de SIA
 - b) Raça
 - c) Data de nascimento
 - d) Data de entrada na exploração
 - e) Data de início e data do fim da última época reprodutiva
 - f) Rácio macho/fêmea
 - g) Período de repouso sexual
 - h) Lote respetivo

Os inquéritos foram respondidos pelos criadores durante as visitas efetuadas às explorações. Foram visitadas 25 explorações das quais obtiveram-se 21 inquéritos. Nos anexos desta dissertação, é possível encontrar um exemplar do inquérito epidemiológico realizado aos criadores (Anexo 1).

5.1.2. Exames andrológicos

Relativamente aos touros que realizaram exame andrológico (EA), segue-se a descrição sumária dos parâmetros que integram a ficha de registo de acompanhamento do EA elaborada pelo HVME:

- 1) Identificação do animal
 - a) Número de SIA
- 2) Exame clínico geral
 - a) Avaliação da condição corporal
- 3) Exame do trato genital
 - a) Pénis e Prepúcio
 - i. Exteriorização do pénis
 - ii. Integridade do prepúcio
 - iii. Integridade do pénis
 - b) Escroto
 - i. Integridade do escroto
 - ii. Perímetro escrotal
 - iii. Inflamações
- 4) Espermograma
 - a) Ejaculação
 - i. Se executou ejaculação
 - ii. Se a ejaculação foi dolorosa
 - b) Número de ciclos requeridos para ejacular
 - c) Avaliação Macroscópica
 - i. Volume
 - ii. Viscosidade
 - iii. Densidade
 - iv. Concentração
 - v. Coloração
 - vi. Cheiro
 - d) Avaliação Microscópica
 - i. Mobilidade massal
 - ii. Mobilidade individual (em percentagem)
 - iii. Tipo de movimentos anormais
 - iv. Anomalias morfológicas (incidência em percentagem)
 - v. Tipo de anomalias morfológicas (cabeça, peça intermédia, cauda)
 - vi. Outras células (inflamatórias, descamação, outras)

Encontra-se disponível em anexo, um exemplar da ficha de registo do EA (Anexo 2).

5.1.3. Métodos de diagnósticos da Campilobacteriose Genital Bovina

Como método de diagnóstico, foi possível utilizar duas técnicas diferentes: a Imunofluorescência Direta (IFD) para identificação de *Campylobacter spp.*; e o PCR quantitativo (qPCR) para detecção do agente etiológico da CGB, o *Campylobacter fetus* subespécie *venerealis* (*Cfv*). Foi ainda estudado qual seria a melhor abordagem para testagem da CGB, se seria útil utilizar os dois testes em série, e qual seria o custo das duas abordagens.

5.1.3.1. Seleção dos touros e colheita da amostra

A escolha dos touros recaiu sobre um único critério, nomeadamente a idade do animal que desejar-se-ia igual ou superior a 3 anos de idade. Todas as amostras submetidas à técnica de IFD foram recolhidas após um período de repouso sexual dos touros, ao contrário das amostras para prova de qPCR que apenas foram possível recolher durante a época de reprodução dos efetivos.

Ainda, em relação às amostras para IFD e por questões logísticas, só se realizou uma colheita por animal, julgando-se assim que, a frequência relativa obtida encontrar-se-á subestimada devido ao baixo limite de detecção da técnica e à impossibilidade de se realizar três colheitas por animal de forma a diminuir o número de falsos negativos (Pellegrin et al., 2003).

O protocolo de colheita de amostras foi elaborado pelo HVME, tendo sido utilizado o método de raspagem prepucial. Este consistiu na adaptação das recomendações práticas sugeridas pelo Laboratório Azul (Laboratorio Azul Diagnóstico S.A., Argentina), local onde foram adquiridos os raspadores plásticos². Segue-se a sua breve descrição:

- 1) Condução do touro até à manga para contenção apropriada do animal;
- 2) Correta higienização da abertura prepucial através do corte dos pêlos prepuciais e limpeza da região com toalhas de papel. Sempre que a abertura prepucial se encontrar muito conspurcada, efetuar o rebatimento do prepúcio durante a colocação e a remoção dos raspadores. Sempre que o animal urinar, repetir limpeza prepucial;
- 3) Introdução de dois raspadores na cavidade prepucial, um para cada diagnóstico, simultaneamente;
- 4) Realização de aproximadamente 20 movimentos ântero-posteriores no fundo da cavidade prepucial;
- 5) Remoção dos raspadores seguindo-se a sua submersão nos tubos de recolha, com colocação de um dos raspadores no tubo de solução fenolada (PBS pH 7,2) para pesquisa de *Campylobacter spp.* e do segundo raspador no tubo com RNAlater® para pesquisa de *Cfv*;

² <http://www.laboratorioazul.com.ar/Raspadores/Raspadores.aspx>

- 6) Realização de movimentos rotacionais com os raspadores para libertação do material colhido para as respetivas soluções de transporte;
- 7) Correta identificação dos tubos de recolha e envio do material para laboratório devidamente acondicionado em atmosfera refrigerada, aproximadamente 4º C.

5.1.3.2. Diagnóstico por técnica de Imunofluorescência Direta

O centro de reprodução do HVME iniciou em Setembro de 2012 a pesquisa de *Campylobacter* spp. através do método de IFD. Para esse estudo foi adquirido um conjugado *anti-Campylobacter fetus* com origem num soro policlonal de coelho, hiperimunizado com *Campylobacter fetus* subespécie *fetus* e *Campylobacter fetus* subespécie *venerealis*, conjugado com isotiocianato de fluoresceína (CAMPY-AZUL®). A sensibilidade e especificidade contra ambas as subespécies de *Campylobacter fetus* são asseguradas pelo laboratório onde é produzido o conjugado, o qual oferece ainda especificidade contra *Campylobacter sputorum* subespécie *bubulus* e *Campylobacter hyointestinalis*³.

A pesquisa de *Campylobacter* spp. através do método de IFD foi efetuada no Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Évora, sob orientação da Professora Doutora Cristina Queiroga. O protocolo laboratorial para realização desta técnica teve por base o “Manual de Técnicas de Diagnóstico e Vacinas para Animais Terrestres”, capítulo 2.4.5 (Wagenaar, 2008), sendo ele:

- 1) Centrifugação dos tubos com o material recolhido a 600 g, a 4ºC, durante 10 minutos;
- 2) Transferência do sobrenadante para um novo tubo;
- 3) Centrifugação do sobrenadante a 13 000 g, a 4ºC, durante 30 minutos;
- 4) Rejeição do sobrenadante. Adição de 500 µL de PSB pH 7,2 ao *pellet*;
- 5) Remoção de 20 µL de suspensão e respetiva colocação numa lâmina, sem realizar esfregaço, em duplicado;
- 6) Para controlo negativo e positivo, colocação de 20 µL de solução PBS pH 7,2 ou de 20 µL de suspensão de *Campylobacter fetus* (Laboratorio Azul Diagnóstico S.A., Argentina) numa lâmina;
- 7) Secagem das lâminas numa estufa a 37ºC e fixação com acetona a - 20 °C durante 30 minutos;
- 8) Adição de 20 ou 25 µL de conjugado fluorescente *anti-Campylobacter fetus* numa diluição de 1:30 em todas as lâminas;
- 9) Incubação das lâminas durante 30 minutos, a 37ºC, em câmara húmida;
- 10) Lavagem das lâminas com solução PBS pH 7,2 três vezes, durante 10 minutos, e uma vez com água destilada, sem incidir diretamente sobre o material fixado;

³ <http://www.laboratorioazul.com.ar/CampyAzul/CampyAzul.aspx>

- 11) Montagem das lâminas com solução tamponada de glicerol pH 9,2;
- 12) Avaliação das lâminas com microscópio de fluorescência para identificação de formas microbianas fluorescentes com morfologia típica de *Campylobacter spp.* A presença de uma única bactéria determina que a amostra é positiva.

5.1.3.3. Diagnóstico molecular por PCR quantitativo

Por sua vez, o diagnóstico molecular de *Cfv* foi efetuado por qPCR no Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, sob orientação da Professora Doutora Ana Duarte. Este teve por base o ensaio publicado por McMillen et al. (2006), que utiliza um par de *primers* específicos dirigidos para o gene *parAlike*, e uma sonda TaqMan® marcada no extremo 5' com o *reporter* FAM e no extremo 3' com o *quencher* Minor Groove Binder (MGB), permitindo temperaturas de *annealing* superiores para sondas de menores dimensões, e aumentando assim a especificidade da reação.

Para controle positivo foi utilizado uma estirpe padrão de *Campylobacter fetus* subespécie *venerealis* (DSM18826), da qual após cultura se extraiu o DNA genómico utilizando o kit comercial Dneasy Blood & Tissue® (Qiagen™, Alemanha), com o protocolo corrigido para bactérias Gram negativas. Para extração de DNA total 200 µl das amostras prepuciais foram processadas em paralelo nas mesmas condições.

Após a extração, o DNA foi quantificado no Nanodrop 2000c Spectrophotometer® (Thermo Scientific), e armazenado a -20°C até utilização.

A reação de amplificação foi realizada no volume final de 20 µl, com 10 µl de TaqMan® Gene Expression Master Mix 2x concentrada, que inclui: o tampão de reação, a enzima e os dNTPs necessários; juntamente com 0,9 µM de *primers forward* e *reverse*, 0,25 µM de sonda e 50-100ng de DNA.

Por último, as reações foram amplificadas no termociclador Real-time 7300 (Applied Biosystems) utilizando o ciclo de amplificação de 95°C/15min, seguido de 40 ciclos a 90°C/15seg e finalmente, 60°C/1min.

Para determinar a eficiência da reação de qPCR, o limite de deteção da técnica e, quantificar o número de cópias de *Cfv* por cada 100 ng de DNA extraído, procedeu-se à elaboração de curvas *standard* através de diluições seriadas 1 para 5 da estirpe padrão *Campylobacter fetus* subespécie *venerealis* (DSM18826), com uma concentração inicial de $2,7 \times 10^7$ /reação.

Cada diluição foi submetida à amplificação por qPCR em duplicado. O Gráfico 1 demonstra as curvas *standard* que foram obtidas, e que permitiram correlacionar o número de cópias presentes em cada logaritmo com um valor de Ct.

O Ct, denominado na literatura inglesa por *cycle threshold*, é o ciclo em que se inicia a amplificação e cujo sinal de fluorescência cruza o *threshold fluorescence level* (nível a partir

do qual a emissão de fluorescência se distingue do *background*). A aplicação de uma regressão linear a estes pontos permite calcular a eficiência da reação (E) através do declive da recta (*slope*), e o limite de deteção da reação (medida direta da sensibilidade do ensaio) por intermédio do valor de Ct para o qual é possível obter um resultado positivo com a mais pequena diluição.

A partir da curva *standard* é então possível conhecer o número de cópias de *Cfv* que cada *template* de DNA extraído possui, utilizando o seu valor de Ct e extrapolando posteriormente o número de cópias/reação com base na recta de regressão linear.

A eficiência da reação deste ensaio foi de 90,3%, correspondendo a uma *slope* de -3,58. Este valor encontra-se dentro do intervalo aconselhável (90% a 100%), o que significa que durante a fase exponencial da reação ocorreu a duplicação de produto amplificado a cada ciclo (Life Technologies Corporation, 2012). Verificou-se também que a sensibilidade do ensaio foi de 10 cópias/reação.

O ensaio só foi validado quando se obteve amplificação dos controlos positivos (Gráfico 1) e quando nos controlos negativos não se observou amplificação (Gráfico 2).

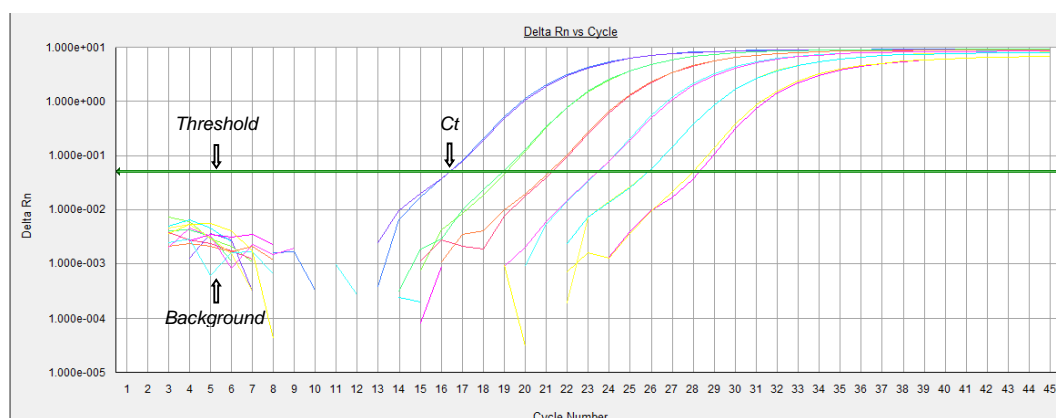


Gráfico 1. Representação da reação de qPCR com curvas *standard* do controlo positivo *Campylobacter fetus* subespécie *venerealis* (DSM18826). Cada diluição seriada em duplicado, nomeadamente: (—) diluição de 1/5; (—) diluição de 1/25; (—) diluição de 1/125; (—) diluição de 1/625; (—) diluição de 1/3125; (—) diluição de 1/15625.

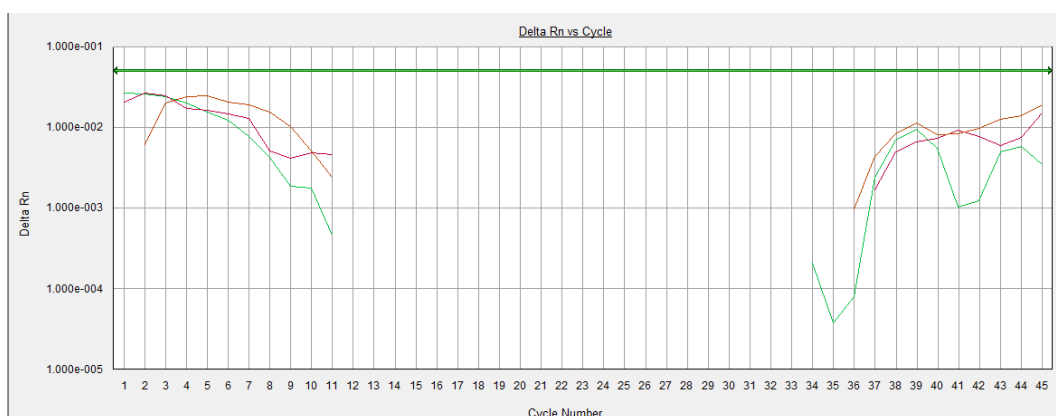


Gráfico 2. Representação da curva do controlo negativo resultante da reação de qPCR.

A especificidade dos *primers* e da sonda TaqMan® foi aferida pelo programa BLAST (“*Basic Local Alignment Search Tool*”), o que permitiu avaliar a identidade e especificidade das três sequências contra a sua base de dados (Tabela 5).

Tabela 5. *Primers* e sonda TaqMan® marcada no extremo 3' com *quencher* MGB.

	Sequência (5' para 3')	
	Complementar reverso	
Forward primer	CCCAGTTATCCCAAGCGATCT	
Reverse primer	CGGTTGGATTATAAATTTTAGCTTGGT	ACCAAGCTAAAATTTATAATCCAACCG
Sonda TaqMan®	6-FAM-CATGTTATTTAATACCGCAA MGB	TTGCGGTATTAAATAACATG

Adicionalmente, todas as amostras positivas foram sequenciadas e submetidas a PCR convencional com base no ensaio publicado por Hum et al. (1997). Os dois pares de *primers* utilizados e as respectivas sequências nucleotídicas encontram-se na Tabela 6.

Tabela 6. *Primers* desenvolvidos por Hum et al. (1997) e utilizados no PCR convencional.

	Primer	Sequência (5' para 3')	Tamanho da sequência
p/ <i>Campylobacter fetus</i>	Forward primer (MG3F)	GGTAGCCGCAGCTGCTAAGAT	764 pb
	Reverse primer (MG4R)	TAGCTACAATAACGACAAC	
p/ <i>Campylobacter fetus</i> subespécie <i>venerealis</i>	Forward primer (VenSF)	CTTAGCAGTTTGCGATATTGCCATT	142 pb
	Reverse primer (VenSR)	GCTTTTGAGATAACAATAAGAGCTT	

Como controlo positivo, foram utilizadas as estirpes padrão de *Campylobacter fetus* subespécie *venerealis* (DSM18826) e de *Campylobacter fetus* subespécie *fetus* (DSM538) (Smith & Taylor, 1919). Após cultura, extraiu-se o DNA genómico de ambas as estirpes com o Dneasy Blood and Tissue Kit® (Qiagen™, Alemanha), utilizando o protocolo corrigido para bactérias Gram negativas.

A reação de amplificação foi realizada no volume final de 25 µl, com Mix 5 Prime, que inclui: o tampão de reação, a enzima e os dNTPs necessários; juntamente com 1 µM de *primers* forward e reverse, 25 µl de Milli-Q® e 100 ng de DNA.

As reações foram amplificadas no termociclador Real-time 7300 (Applied Biosystems) utilizando o ciclo de amplificação de 96°C/10min, seguido de 35 ciclos a 96°C/20seg, 50°C/20seg, 72°C/90seg e finalmente, 72°C/10min.

Os produtos amplificados por PCR convencional foram analisados por electroforese horizontal, num gel de agarose com GelRed, para verificar a correspondência entre o peso molecular obtido e o peso molecular esperado.

5.1.4. Análise estatística

Para avaliação dos dados recolhidos procedeu-se à compilação de toda informação numa base de dados delineada no software Microsoft Office Excel 2010[®]. Posteriormente, realizou-se a análise estatística através das plataformas de cálculo Epitools⁴ e software R[®] (versão 3.1.0).

A primeira plataforma permitiu determinar a prevalência da CGB com base nos resultados positivos ao teste de qPCR, assim como os intervalos de confiança (IC) de 95%, segundo os limites de Blaker. Para realizar o seu cálculo, considerou-se os parâmetros de sensibilidade e especificidade do qPCR iguais a 0,99 e 0,99, respetivamente.

O software R[®] Commander permitiu realizar o cálculo de frequências relativas, médias, medianas, e ainda valores mínimos e máximos. Por último, utilizou-se também o software Microsoft Office Excel[®] como suporte de construção de gráficos e tabelas.

⁴ <http://epitools.ausvet.com.au/content.php?page=TruePrevalence>

5.2. Resultados

5.2.1. Caracterização e localização geográfica das explorações

Após a realização dos inquéritos epidemiológicos, verificou-se que a informação reunida para caracterização das 25 explorações encontrava-se demasiado incompleta devido às várias lacunas que resultaram do preenchimento dos inquéritos. Não obstante a colaboração dos criadores em responderem aos questionários, é de salientar o elevado grau de incerteza que foi demonstrado pelos inqueridos relativamente a questões que exigiam a consulta de registos e uma maior perceção da realidade concreta das explorações (por exemplo, datas e elementos que implicavam a interpretação dos dados reprodutivos das vacadas).

Na impossibilidade de uma resposta imediata, solicitou-se o envio dessa documentação após a visita à exploração, mas nunca se conseguiu obter resposta. Assim, o preenchimento dos grupos 6 e 8 demonstrou-se impossível em todas as explorações.

A generalidade da informação obtida derivou de conhecimento observacional e como tal impreciso. Face aos obstáculos encontrados, foi necessária uma reestruturação da informação disponível para caracterização das explorações que participaram neste trabalho. Os resultados obtidos através dos inquéritos epidemiológicos e registos informáticos disponibilizados pelo HVME, e que permitiram caracterizar as explorações são apresentados na Tabela 7. Certifica-se que todas as explorações possuíam sistema de produção extensivo, sendo utilizado a monta natural como método reprodutivo. Todas as explorações detinham classificação sanitária B4 T3 L4⁵.

Na Figura 3, encontram-se representadas geograficamente as 25 explorações que participaram neste estudo.

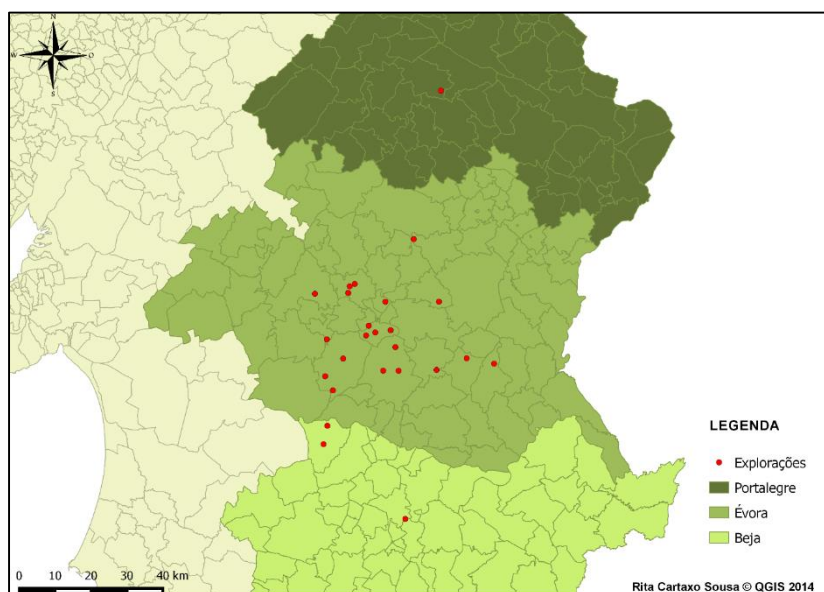


Figura 3. Localização geográfica das explorações testadas por Imunofluorescência Direta (n=25).

⁵ Oficialmente indomne à Brucelose, Tuberculose e Leucose Bovina, respetivamente.

Tabela 7. Caracterização das explorações em estudo.

Nº de Ordem	Concelho	Nº de fêmeas à cobrição	Nº de Touros	Época de reprodução (período)	Controlo reprodutivo	Aquisição de touros	Exame andrológico	Touros testados para CGB ^a e TB ^b
1	Évora	300	10	S (Janeiro a Setembro)	S	N	S	N
2	Alter do Chão	270	5	S (de Outubro a Agosto)	N	S	S	N
3	Montemor-o-Novo	283	7	S (Dezembro a Setembro)	S	N	S	N
4	Évora	620	14	N	N	S	S	N
5	Évora	270	7	S (de Setembro a Maio)	N	S	S	N
6	Beja	404	11	S (Dezembro a Setembro)	S	S	S	N
7	Évora	206	10	S (Novembro a Agosto)	S	N	S	N
8	Évora	208	5	S (Novembro a Agosto)	S	N	S	N
9	Évora	270	5	S (Novembro a Agosto)	S	N	S	N
10	Évora	165	4	N	N	S	S	N
11	Évora	174	3	S (Janeiro a Julho)	S	N	S	N
12	Évora	160	3	S (Dezembro a Setembro)	S	S	S	N
13	Évora	71	1*	S (de Janeiro a Setembro)	S	N	S	N
14	Évora	220	6	N	N	N	S	N
15	Évora	347	8	S (Dezembro a Julho)	N	N	S	N
16	Évora	60	2	S (Dezembro a Julho)	N	N	S	N
17	Évora	210	5	N	N	S	S	N
18	Évora	180	4	N	N	S	S	N
19	Évora	140	3	S (Janeiro a Julho)	S	S	S	N
20	Alvito	227	7	S (de Abril a Setembro)	N	S	S	N
21	Estremoz	287	7	S (de Abril a Setembro)	N	S	S	N
22	Évora	400	10	S (Dezembro a Setembro)	N	N	S	N
23	Alvito	250	5	N	S	S	S	N
24	Évora	170	4	S (Novembro a Agosto)	S	S	S	N
25	Reguengos de Monsaraz	120	3	S (Novembro a Agosto)	S	S	S	N

S: Sim; N: Não
^aCampilobacteriose Genital Bovina. ^bTricomoniase Bovina
 *Cobrição natural + IA

5.2.2. Caracterização dos touros submetidos a recolha de amostra prepucial

Do total de 149 touros existentes nas explorações, 118 foram submetidos à técnica de IFD. As Figuras 4 e 5 caracterizam a população de touros submetidos a este teste quanto à raça e idade.

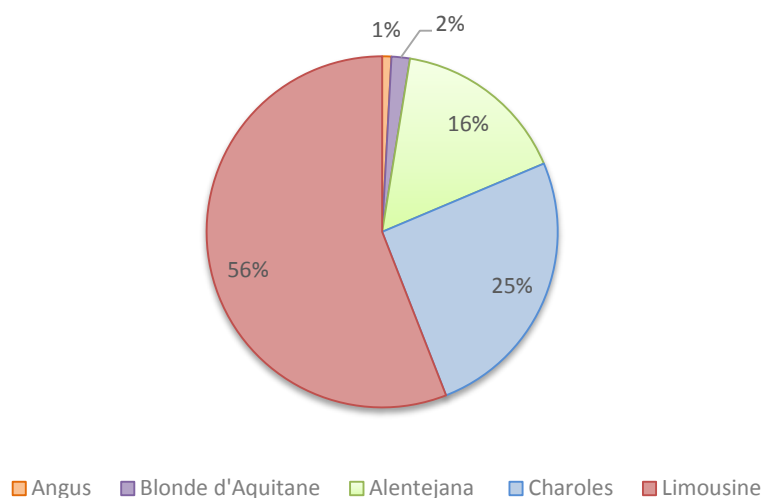


Figura 4. Distribuição relativa da raça dos touros cujas amostras prepuciais foram testadas por Imunofluorescência Direta (n=118).

Segundo a figura 4, podemos afirmar que os touros da raça Limousine predominaram relativamente às restantes raças presentes.

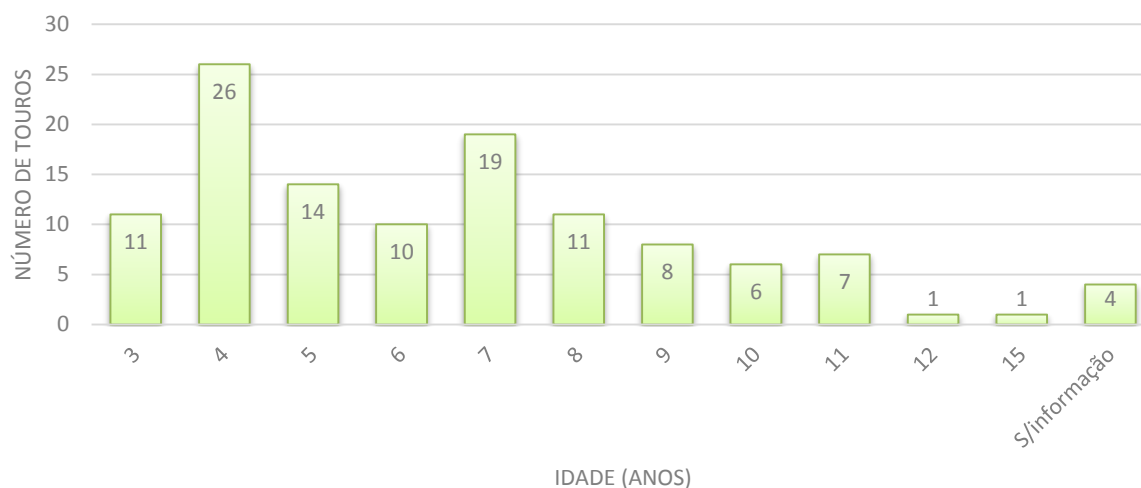


Figura 5. Caracterização da idade dos touros cujas amostras prepuciais foram testadas por Imunofluorescência Direta (n=118).

Atendendo à figura 5, a idade média dos touros submetidos a IFD foi de 6 anos.

5.2.3. CGB: resultados do teste de Imunofluorescência Direta

As Tabelas 8 e 9 apresentam a frequência relativa quanto à positividade do teste de IFD.

Tabela 8. Resultados obtidos por Imunofluorescência Direta por animal.

IFD		
	n	Infetados (%)
Positivos	51	43%
Duvidosos^a	16	14%
Negativos	51	43%
TOTAL	118	100%

^a Presença de pelo menos, uma bactéria com morfologia típica de *Campylobacter spp.* em apenas uma das duas lâminas.

Tabela 9. Resultados obtidos por Imunofluorescência Direta por exploração.

IFD		
	n	Infetados (%)
Positiva^a	19	76%
Duvidosa^b	2	8%
Negativa	4	16%
TOTAL	25	100%

^a Exploração com pelo menos, um touro positivo.

^b Exploração com pelo menos, um touro com teste duvidoso (presença de pelo menos, uma bactéria com morfologia típica de *Campylobacter spp.* em apenas uma das duas lâminas).

Para facilitar a interpretação dos resultados concedidos pelo laboratório, determinou-se que as amostras positivas seriam somadas às amostras duvidosas, pois de acordo com o critério indicado por Figueiredo et al. (2002) basta a detecção de uma única bactéria numa das duas lâminas para se considerar uma amostra como positiva.

Deste modo, é possível afirmar que de um total de 118 touros e 25 explorações sujeitas à IFD, 67 (57%) animais e 21 (84%) explorações apresentaram resultado positivo.

5.2.4. CGB: resultados do teste de PCR quantitativo

Dos 118 touros submetidos à técnica de IFD, uma subamostragem de 29 animais (total de 10 explorações) foi sujeita à recolha de amostra prepucial para testagem de *Cfv* por qPCR. Seleccionaram-se aleatoriamente 14 touros com resultado positivo à IFD, 9 touros com resultado duvidoso e 6 touros com resultado negativo.

As Tabelas 10 e 11 apresentam a frequência relativa da positividade ao teste de qPCR por touro e por exploração.

Tabela 10. Resultados obtidos por qPCR por animal.

qPCR (<i>Cfv</i>)		
	Testados (n)	Infetados (%)
Positivos	6	21%*
Negativos	23	79%
TOTAL	29	100%

*IC 95% = 0,098 – 0,384.

Salienta-se que dos 6 touros positivos à infecção por *Cfv*, 3 animais detinham resultado positivo à prova de IFD e os restantes, classificação duvidosa.

Tabela 11. Resultados obtidos por qPCR por exploração.

qPCR (<i>Cfv</i>)		
	Testados (n)	Infetados (%)
Positivos^a	4	40%*
Negativos	6	60%
TOTAL	10	100%

^a Exploração com pelo menos, um touro positivo.

*IC 95% = 0,168 – 0,687.

A técnica de qPCR permitiu quantificar também o produto final amplificado, e extrapolar a quantidade inicial de DNA alvo extraído em cada amostra positiva (Tabela 12).

Tabela 12. Quantificação do DNA alvo presente nas 6 amostras positivas a *Campylobacter fetus* subespécie *venerealis*.

Ct ^a	Nº de células ^b	Nº de identificação
22,35	2,4 x 10 ⁵	79
24,66	4,6 x 10 ⁴	72
26,09	1,7 x 10 ⁴	47
26,82	1,0 x 10 ⁴	87
28,07	4,2 x 10 ³	50
28,13	4,0 x 10 ³	43

^a Cycle threshold (ciclo a partir do qual se inicia a amplificação)

^b Para uma quantidade total de 100 ng de DNA extraído a partir do sedimento de material colhido.

De acordo com a Tabela 12, podemos observar que a quantidade inicial de DNA presente na amostra está correlacionada com o *cycle threshold* (Ct), e uma maior concentração de DNA alvo no início da reação faz com que sejam necessários menos ciclos para que o sinal de fluorescência ultrapasse o *threshold fluorescence level*. O Gráfico 3 evidencia o resultado positivo de 4 amostras biológicas sujeitas à reação de amplificação por qPCR.

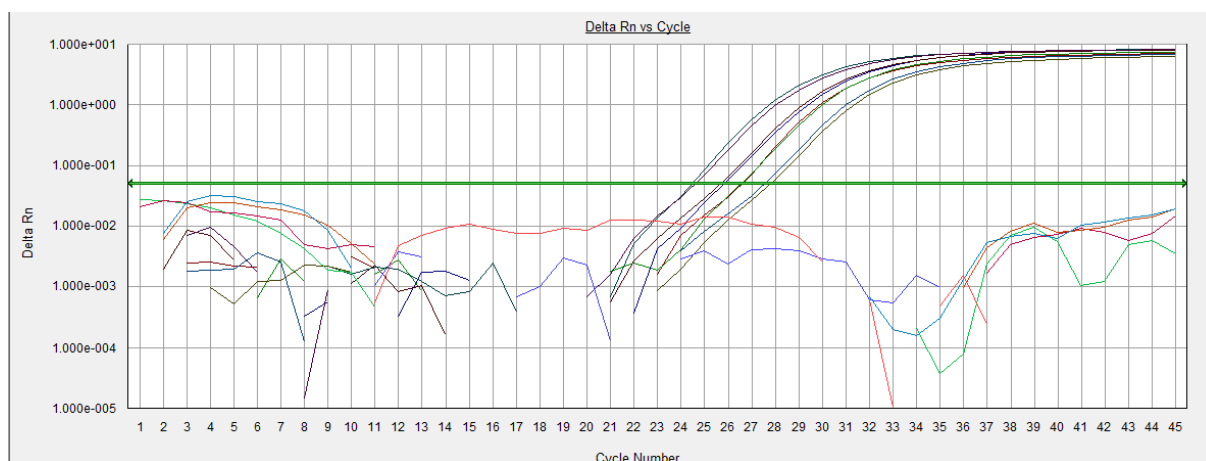


Gráfico 3. Representação da reação de qPCR com 4 amostras positivas. Cada amostra corrida em duplicado (por ordem crescente de Ct: touros nº 72, 47, 87 e 50).

As amostras positivas a qPCR foram sequenciadas de forma a confirmar a identidade dos produtos amplificados (Figura 6), comparando-as depois contra a base de dados do Genbank, por BLAST⁶ (Tabela 5).

As sequências nucleotídicas da Figura 6 apresentaram algumas diferenças em relação às sequências correspondentes na Tabela 5, tendo sido verificado a presença de polimorfismos por substituição de 5 nucleótidos com 1 variação na região complementar da sonda TaqMan[®] e 4 variações no *primer reverse*. Surpreendentemente, todos os polimorfismos observados coincidem entre si, repetindo-se em todas as sequências.

A Figura 7 ilustra o resultado obtido por electroforese das 6 amostras positivas à infecção por Cfv e que foram submetidas a PCR convencional para comprovar a fiabilidade da técnica de qPCR. Todas as amostras positivas a qPCR mostraram-se positivas ao PCR convencional.

⁶ <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

ID43 CfvMin T-CTTAGCAGTTTGCATATTGCCATTATCCCAGTTATCCCAAGCGATCTTGATATTGCGGTATTAAATAAGATGATTTTGGTATTTGAACAAGCTAAAATTTACAATCCCAACGCAAAAGCT-C

ID47 CfvMin T-CTTAGCAGTTTGCATATTGCCATTATCCCAGTTATCCCAAGCGATCTTGATATTGCGGTATTAAATAAGATGATTTTGGTATTTGAACAAGCTAAAATTTACAATCCCAACGCAAAAGCT-C

ID50 CfvMin T-CTTAGCAGTTTGCATATTGCCATTATCCCAGTTATCCCAAGCGATCTTGATATTGCGGTATTAAATAAGATGATTTTGGTATTTGAACAAGCTAAAATTTACAATCCCAACGCAAAAGCT-C

ID72 CfvMin T-CTTAGCAGTTTGCATATTGCCATTATCCCAGTTATCCCAAGCGATCTTGATATTGCGGTATTAAATAAGATGATTTTGGTATTTGAACAAGCTAAAATTTACAATCCCAACGCAAAAGCT-C

ID79 CfvMin T-CTTAGCAGTTTGCATATTGCCATTATCCCAGTTATCCCAAGCGATCTTGATATTGCGGTATTAAATAAGATGATTTTGGTATTTGAACAAGCTAAAATTTACAATCCCAACGCAAAAGCT-C

ID87 CfvMin T-CTTAGCAGTTTGCATATTGCCATTATCCCAGTTATCCCAAGCGATCTTGATATTGCGGTATTAAATAAGATGATTTTGGTATTTGAACAAGCTAAAATTTACAATCCCAACGCAAAAGCT-C

Figura 6. Sequenciação da região *parA* das 6 amostras positivas a *Campylobacter fetus* subespécie *venerealis*. (AZUL) Primer forward e primer reverse. (VERDE) Sonda TaqMan®. (VERMELHO) Polimorfismos.

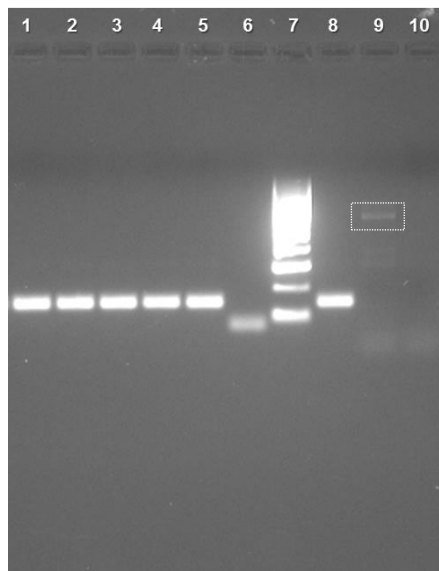


Figura 7. Electroforese horizontal em gel de agarose com GelRed dos produtos amplificados por PCR convencional. Amostras positivas a *Campylobacter fetus* subespécie *venerealis* (1 a 6); Marcador de massa molecular de 100 pb (7); Controlo positivo de *Campylobacter fetus* subespécie *venerealis* com um fragmento de 142 pb (8); Controlo positivo de *Campylobacter fetus* subespécie *fetus* com fragmento de 764 pb (9); Controlo negativo sem DNA (10).

5.2.5. CGB: hipotéticos fatores de risco e sua relação com a infecção por *Campylobacter fetus* subespécie *venerealis*

A Tabela 13 reúne alguns fatores de risco que segundo Thrusfield (2005) podem estar associados à distribuição da Campilobacteriose Genital Bovina, com o objetivo de os correlacionar com os resultados obtidos relativamente à infecção por *Cfv*.

Tabela 13. Hipotéticos fatores de risco e sua relação com a infecção por *Campylobacter fetus* subespécie *venerealis*.

	Variáveis	Categorias	qPCR (<i>Cfv</i>)	
			Testados (n)	Infetados (%)
TOUROS	Idade (anos)	3	2	1 (50)
		4	10	1 (10)
		5	7	2 (29)
		6	1	0
		7	4	2 (50)
		8	1	0
		9	1	0
		10	2	0
		11	1	0
	Raça	Alentejana	4	3 (75)
		Charolês	5	0
		Limousine	20	3 (15)
	Localização (concelho)	Alvito	5	1 (20)
		Beja	6	0
		Évora	13	5 (38)
		Estremoz	5	0

5.2.6. CGB: resultados do exame andrológico dos touros infetados com *Campylobacter fetus* subespécie *venerealis*

A Tabela 14 apresenta os resultados do exame andrológico de 4 animais positivos à CGB.

Tabela 14. Resultados dos exames andrológicos de 4 touros testados positivos à Campilobacteriose Genital Bovina.

REGISTO DE PARÂMETROS						
Nº Identificação	Exame clínico	Avaliação Macroscópica		Avaliação Microscópica		
	Avaliação da CC (1 - 5)	Perímetro escrotal (cm)	Volume (ml)	Mobilidade Massal	Mobilidade Individual (% mpr)	Formas anormais (%)
43	4,5	36	6	Bom	80	10
50	4	38	6	Bom	80	10
79	4	38	6	Bom	90	5
87	4	38	4	Bom	80	10

5.3. Discussão

O presente trabalho experimental permitiu confirmar a presença do agente *Campylobacter fetus* subespécie *venerealis* (*Cfv*) em amostras prepuciais de touros na região do Alentejo e determinar que de acordo com a amostra estudada, a sua prevalência será de aproximadamente 21% (20,7%; IC 95%: 0,098 – 0,384). Atesta-se assim, o perfil endémico da Campilobacteriose Genital Bovina (CGB) cuja prevalência em Portugal encontra-se em conformidade com estudos recentes realizados na Nigéria e na Nova Zelândia, onde 13,36% e 28,4% dos touros encontravam-se infetados por *Cfv*, respetivamente (Mai et al., 2013; Heuer et al., 2010).

Ao nível da prevalência por exploração, e considerando-se como uma exploração positiva aquela que apresentar pelo menos um touro infetado por *Cfv*, a prevalência obtida foi de 40% (IC 95%: 0,168 – 0,687).

A pesquisa da bactéria *Cfv* foi realizada através da aplicação de métodos moleculares, nomeadamente a técnica de PCR quantitativo (qPCR) recentemente otimizada para utilização em amostras prepuciais, tendo por base o ensaio publicado por McMillen et al. (2006). Os resultados laboratoriais obtidos permitiram constatar que esta técnica é adequada ao despiste de CGB em Portugal, constituindo uma excelente alternativa ao método bacteriológico (*gold standard*), pois permite ultrapassar as respetivas limitações que este possui, e que ao longo dos anos contribuíram para que o despiste de *Cfv* durante os exames andrológicos fosse negligenciado, visto que um resultado negativo não garantia a ausência de infeção por *Cfv* no touro.

O ensaio de qPCR demonstrou um elevado nível de sensibilidade, alcançando um limite de deteção de 10 cópias de *Cfv*/reação. Para confirmar a especificidade dos *primers* e da sonda utilizada por McMillen et al. (2006), recorreu-se ao programa BLAST. Mas, para assegurar a veracidade dos resultados, todas as amostras positivas foram submetidas a sequenciação e ainda, análise por PCR convencional com base no ensaio publicado por Hum et al. (1997).

A pesquisa do serovar *Campylobacter fetus* subespécie *venerealis intermedius*, mencionado em 4.4. e 4.4.2., não se fez incluir neste trabalho pois permanece até à presente data dependente do seu comportamento bioquímico para identificação através do método bacteriológico.

Atendendo à caracterização das explorações (Tabela 7), podemos constatar que 72% das explorações situavam-se no concelho de Évora. Em relação à dimensão das explorações, e efetivo reprodutor em particular, os resultados variaram entre as 60 e 620 fêmeas à cobrição (mediana 220) e 1 a 14 touros por exploração (mediana 5). 76% das explorações realizavam época de reprodução, cuja duração variava entre os 6 e os 11 meses (média 9 meses).

Observou-se uma duração da época de reprodução bastante heterogénea entre as explorações situadas no mesmo concelho (Évora), apesar de todas elas possuírem o mesmo objetivo produtivo (maior número de vitelos por vaca e por ano). Encontrando-se a duração da época de reprodução dependente de vários fatores e entre eles a disponibilidade alimentar que por sua vez está sujeita ao ciclo de produção forrageira local, julga-se que a preferência pessoal continua a sobrepor-se relativamente à escolha da duração da época de reprodução. Isto porque, em termos de crescimento de pastagem certamente que explorações tão próximas entre si não apresentam alterações significativas (Figura 3). De qualquer modo, trata-se apenas de uma suposição já que não foi possível à autora averiguar qual seria o manejo alimentar exercido em cada exploração. Recorda-se ainda que segundo Lopes da Costa (2008), a escolha do sistema de manejo praticado depende dos objetivos produtivos, da situação inicial e do tipo de mercado (escoamento) para os produtos gerados.

Quanto ao controlo reprodutivo, verificou-se que 52% das explorações já realizam acompanhamento das suas vacadas, o que pode refletir uma maior consciencialização para a sua importância enquanto ferramenta imprescindível ao aumento da eficiência reprodutiva dos efetivos bovinos de produção de carne.

Por último, 56% das explorações confirmaram a compra de touros. Uma vez que nenhuma das explorações realizaram a testagem para agentes de transmissão venérea, e como advertido em 4.2, relembra-se que a aquisição de touros em idade reprodutiva pode constituir um fator de risco para a entrada de *Cfv* nas explorações. Quanto à comprovação da aptidão reprodutiva todas as explorações já recorreram à realização deste exame pelo menos uma vez em cada touro. Por isso, verifica-se que continua a ser difícil convencer os criadores a pedir exames de função reprodutiva de forma anual para touros já usados em épocas reprodutivas anteriores.

Relativamente aos resultados obtidos por qPCR (Tabelas 10 e 11), recolheram-se amostras prepuciais de 29 touros em 10 explorações, dos quais 6 touros em 4 explorações deram resultados positivos. As explorações analisadas por qPCR constam na Tabela 7 e apresentam os números de ordem 1, 5, 6, 7, 12, 14, 15, 16, 20 e 21. Já as explorações identificadas como positivas ao agente *Cfv* foram as explorações com o número 7, 14, 15 e 20.

Das 4 explorações positivas ao qPCR apenas uma (exploração nº 7) tinha iniciado recentemente acompanhamento reprodutivo com o HVME, e por isso, a ausência de registos completos impossibilitou a autora de avaliar o impacto que touros portadores de *Cfv* provocam na fertilidade da vacada.

De qualquer modo, durante a realização dos inquéritos epidemiológicos nunca qualquer criador admitiu uma diminuição do número de bezerros obtidos na última época reprodutiva comparativamente a anos anteriores, o aumento da repetição de cios ou a existência de abortos (incluído os criadores das explorações nº 7, 14, 15 e 20). Assim, e como referido em

4.4.5., pensa-se que o contacto com o agente já terá ocorrido há alguns anos atrás, e portanto, a fertilidade das vacadas nestas explorações já se encontra estabilizada deixando serem visíveis perdas produtivas.

O qPCR conferiu a possibilidade de quantificar o número de células de *Cfv* presentes em cada amostra de DNA extraída a partir do material prepucial, correlacionando depois esse valor com a idade do touro. A Tabela 12 demonstra os valores encontrados para os 6 touros positivos a qPCR, cujos resultados variaram entre as $2,4 \times 10^5$ a $4,0 \times 10^3$ células/100 ng de DNA.

Os touros nº 47 (exploração nº 7) e 72 (exploração nº 14) foram os animais mais velhos com resultado positivo ao qPCR, cada um com 7 anos de idade. Mas, estes não detiveram o logaritmo mais elevado. Contrariamente, ao touro nº 79 (exploração nº 15) que com 5 anos, obteve um logaritmo de 10^5 . Como as amostras prepuciais foram recolhidas durante o decorrer da época de reprodução, a autora considera que poderá ter ocorrido diluição da carga bacteriana à medida que os touros mais idosos (e possivelmente dominantes) cobriram fêmeas em cio. Por isso, seria útil num próximo ensaio realizar a recolha de amostras após um período de repouso sexual de cerca 3 semanas, de forma a concentrar um maior número de bactérias no prepúcio dos touros, e aí sim, estabelecer relação entre essa quantidade e a idade do animal.

A Figura 6 exhibe a sequenciação nucleotídica do gene *parA* das 6 amostras positivas a qPCR, tendo sido verificado a presença de polimorfismos e a substituição de 5 nucleótidos por 3 aminoácidos distintos na região homóloga da sonda TaqMan® e do *primer reverse*. O significado biológico destas variações é desconhecido, mas evidencia a existência de diversidade genética na população de *Cfv*, o que poderá ter implicações ao nível do diagnóstico molecular.

Willoughby et al. (2005) investigou a aplicação do PCR convencional de Hum et al. (1997) em estirpes de *Campylobacter fetus* isoladas no Reino Unido, e relatou a falta de concordância entre os resultados bacteriológicos e os resultados moleculares. O que levantou a hipótese da estirpe de *Cfv* presente no Reino Unido sofrer de uma alteração na região de ligação dos *primers* VenSF e VenSR, sendo responsável pela incorreta identificação das estirpes laboratoriais de *Cfv* como *Cff*.

Várias investigações foram então direcionadas para a determinação do nível de conservação da sequência alvo dentro do gene *parA*. Averiguando-se posteriormente, padrões de distribuição geográfica associados a estas diferenças (Chaban et al., 2012; Schmidt, Venter & Picard, 2010; Wagenaar, van Bergen, Newell, Grogono-Thomas & Duim, 2001).

A aplicação dos *primers* e sonda TaqMan® de McMillen et al. (2006) foram um êxito neste trabalho, permitindo a sua utilização na pesquisa de *Cfv* em Portugal. Mas, não deixa de ser inquietante que tais eventos de recombinação possam modificar os locais de ligação dos *primers* e/ou sonda, ou até mesmo afetar a sua estabilidade, de modo que a produção de um fragmento amplificado deixe de ser possível. O que sugere que a sequenciação genómica do gene *parA* é essencial para o contínuo desenvolvimento de ferramentas de diagnóstico mais eficazes.

A reduzida população de touros e o número de explorações submetidas à técnica de qPCR não permitiu o estudo de fatores de risco que poderiam estar associados à infeção por *Cfv*. De qualquer modo, reuniram-se na Tabela 13 parâmetros que podem constituir hipotéticos fatores de risco para a CGB, nomeadamente a idade, a raça e a localização geográfica.

A idade média dos touros infetados foi de 5,8 anos, mostrando-se plausível com os pressupostos discutidos em 4.2 e 4.4.4, em como touros mais velhos apresentam maior probabilidade de se encontrarem contaminados devido às características morfológicas do epitélio prepucial. Quanto à raça, a falta de homogeneidade no número de touros testados não permitiu aferir se existiria alguma suscetibilidade associada à mesma. De modo, que apenas será possível afirmar que a raça Limousine foi a raça com maior expressão neste estudo (Figura 4).

Em relação à localização, também a diferença entre o número de categorias testadas não possibilitou qualquer conclusão.

Uma vez que touros portadores de *Cfv* não apresentam lesões visíveis ao nível do aparelho genital, nem alterações de líbido ou diminuição da qualidade do sémen (Noakes et al., 2001), a autora reuniu os resultados do exame andrológico de 4 touros positivos à CGB (Tabela 14), sendo possível observar que todos os animais demonstraram resultados satisfatórios e encontrar-se-iam aptos para serem utilizados como machos reprodutores, caso não se encontrassem infetados por *Cfv*. Logo, a realização deste despiste é indispensável.

A técnica de IFD, referida em 4.4.7.2.1, permite a identificação do agente *Campylobacter fetus* diretamente a partir de amostras biológicas. Porém, uma vez que impossibilita a distinção entre as duas subespécies (Wagenaar, 2008), torna-se imprescindível a realização de um teste confirmatório que seja capaz de identificar posteriormente o agente *Cfv*.

A especificidade do reagente comercial CAMPY-AZUL® acentuou ainda mais essa carência, tendo sido obtido valores como 67 (57%) touros e 21 (84%) explorações positivas a *Campylobacter spp.*, e mostrando-se necessário verificar se o agente *Cfv* encontrar-se-ia presente. Assim, reuniram-se amostras prepuciais de 29 touros, dos quais 26 animais eram

positivos a IFD, e após qPCR confirmou-se que entre os 26 touros com *Campylobacter spp.* apenas 6 animais eram portadores de *Cfv*.

A pesquisa da CGB consiste numa prova completar do exame de função reprodutiva de touros reprodutores, sendo útil ao médico veterinário que realiza o exame a rápida obtenção do resultado de despiste à infecção por *Cfv* para emissão do certificado e decisão final da classificação atribuída ao reprodutor. Apesar da abordagem à CGB através de um sistema de testagem em série, não ser persuasiva do ponto de vista da rapidez com que se obtém o resultado laboratorial final, esta pode ser particularmente interessante em situações em que a doença pesquisada apresenta uma prevalência reduzida ou casos em que ocorrem elevadas penalizações associadas a resultados falsos positivos (Pfeiffer, 2010).

Considerando a técnica de IFD como teste de *screening* para *Campylobacter spp.*, esta possibilitaria numa primeira fase descartar todos os animais negativos. O que pode ser atraente do ponto de vista da redução de custos.

Para além do custo reduzido, o primeiro teste de diagnóstico deve ser também detentor de uma elevada sensibilidade garantindo a identificação do maior número de animais doentes possível. Todavia, o nível de especificidade deve ser também razoável para que o número de falsos positivos sujeitos ao segundo teste (teste confirmatório) seja justificável economicamente (Pfeiffer, 2010).

Um frasco de CAMPY-AZUL® contém 1 ml, permitindo testar 1000 animais numa diluição de 1:30. Ora, uma vez que o reagente comercial importou aproximadamente 500€, isto significa que o custo por animal será de 2€. Juntamente com o restante trabalho laboratorial, a prova de IFD irá custar 3€ por animal.

Já a testagem por qPCR terá um valor de 15€ por animal. Portanto, se considerarmos 100 touros e os submetermos ao rastreio de *Campylobacter spp.* por IFD, a primeira fase da testagem em série terá um custo de 300€.

Como referido em 5.2.3, a proporção de animais positivos à IFD foi de 57%. Voltando ao exemplo anterior, e considerando que após a prova de IFD cerca de 50 touros serão positivos a *Campylobacter spp.*, a testagem por qPCR importará mais 750€.

No total, a pesquisa de *Cfv* através destas duas provas consecutivas irá acarretar 1050€. Se apenas a prova de qPCR for realizada, 100 touros vão apresentar um custo total de 1500€.

Aparentemente, a aplicação da técnica de IFD como prova de *screening* torna todo este processo mais económico (diferença de 450€, ou seja, 4,5€ por animal), mas na prática este sistema apresenta alguns inconvenientes que podem não compensar tamanha diferença. A realização de apenas uma colheita por animal para testagem por IFD, diminui a sensibilidade desta prova (Pellegrin et al., 2003). O que por sua vez aumenta a probabilidade de falsos

negativos, e assim eventuais touros portadores de *Cfv* vão permanecer nas vacadas pois já não serão alvo do teste confirmatório.

Para que cada touro realize duas colheitas, é necessário também que haja disponibilização de recursos humanos para condução dos animais até à manga nas duas etapas, sendo ideal manter os touros separados do efetivo reprodutor feminino até conclusão do diagnóstico. O que implica alterações de manejo e existência de instalações para o devido efeito.

Posto isto, podemos concluir que a pesquisa da CBG através de um sistema de testagem em série dificilmente irá cativar apoiantes. Com uma diferença de 4,5€ por animal, a realização de uma prova de *screening* através da IFD não trará vantagens ao criador em relação à redução de custos face ao planeamento e gestão de meios necessários para a realização de uma segunda prova a aproximadamente 50% da população inicial. E isto, sem assegurar a inequívoca identificação de todos os animais negativos a *Campylobacter spp.*

Considera-se assim, que será mais vantajoso realizar unicamente a técnica de qPCR para pesquisa de CGB.

6. CONCLUSÃO

A Campilobacteriose Genital Bovina (CGB) constitui certamente uma das possíveis causas responsáveis pelos baixos índices reprodutivos das explorações de vacas de carne criadas extensivamente a Sul do país.

Este trabalho consistiu num dos primeiros exemplos da aplicação de métodos moleculares na pesquisa das doenças venéreas clássicas em Portugal, permitindo determinar a prevalência do agente *Campylobacter fetus* subespécie *venerealis* (Cfv), e simultaneamente, apresentar uma nova metodologia de diagnóstico para rastreio da CGB nas nossas vacadas. Os resultados obtidos indiciam uma elevada percentagem de explorações infetadas, tornando-se urgente realizar estudos posteriores que garantam a validação do ensaio desenvolvido, para que instâncias nacionais e internacionais competentes reconheçam a importância da sua integração nos laboratórios nacionais oficiais.

A comparação entre as diferentes técnicas utilizadas revelou que o PCR quantitativo teve um desempenho superior à técnica de Imunofluorescência Direta. É necessário dar continuidade ao despiste das doenças de transmissão venérea durante o exame de função reprodutiva de touros utilizados em sistemas extensivos, e envidarem-se esforços para que futuramente seja possível ampliar a metodologia molecular à pesquisa da Tricomóniose Bovina. Entretanto, é fundamental sensibilizar técnicos e criadores para a importância do acompanhamento reprodutivo e reforço das medidas de biossegurança por forma a identificar causas impeditivas de uma vida reprodutiva normal (e consequente diminuição das taxas de fertilidade), e impedir a entrada e disseminação destes agentes patogénicos nas explorações.

A disponibilidade deste novo método de diagnóstico permitirá conhecer a dinâmica epidemiológica da CGB no nosso país, contribuindo para a implementação de medidas de prevenção e controlo específicas que devem ser adotadas em todas as explorações positivas à infeção por Cfv. Quanto ao impacto económico que esta doença de declaração obrigatória provoca na bovinicultura regional e nacional, apenas será possível realizar esta avaliação em explorações que mantenham registos e índices de produtividade atualizados, tendo este trabalho revelado que ainda há muito a fazer nesta área.

7. BIBLIOGRAFIA

- Alves, T. M., Styne, A.P.R., Miranda, K. L. & Lage, A. P. (2011). Campilobacteriose genital bovina e tricomose genital bovina: epidemiologia, diagnóstico e controle. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 31, 336 – 344.
- Anderson, L. H., Burris, W. R., Johns, J. T. & Bullock, K. D. (2002). Managing Body Condition to Improve Reproductive Efficiency in Beef Cows. Acedido em Agosto de 2013, disponível em: <http://www2.ca.uky.edu/agc/pubs/asc/asc162/asc162.pdf>
- Andersen, K.J., LeFever, D.G., Brinks, J.S. & Odde, K.G. (1991). The use of reproductive tract scoring in beef heifers. *Agri-Practice*, 12, 123 – 128.
- Associação Portuguesa de Criadores da Raça Bovina Limousine (2010). Touros – Maneio alimentar. *Notícias Limousine*, p. 42 – 45.
- Ball, P. J. H. & Peters, A.R. (2004). Reproductive Efficiency in Cattle Production. In P. J. H. Ball & A. R. Peters, *Reproduction in cattle* (3rd ed.). (pp. 1 – 12). Oxford: Blackwell Publishing.
- Bento, J. (2006). Escolha e manutenção de reprodutoras. *Notícias Limousine*, p. 27 – 32.
- Bettencourt, C. & Carolino, N. (2008). Eficiência reprodutiva em bovinos de carne: I – Análise de parâmetros e perspectivas de seleção; II – Fatores ambientais e manejo reprodutivo [abstract]. In Sociedade Portuguesa de Ciências Veterinárias (Eds.), *Congresso Ciências Veterinárias 2008 Livro de Resumos*. Vale de Santarém, Portugal, 27 – 29 Novembro, p. 27.
- Bettencourt, E. & Romão, R. (2009). Exame do Touro Reprodutor. *Notícias Limousine*, p. 43 – 45.
- Bouters, R., De Keyser, J., Vandeplasse, M., Van Aert, A., Brone, E. & Bonte, P. (1973). Vibrio fetus infection in bulls: curative and preventive vaccination. *British Veterinary Journal*, 129, 52 – 57.
- Brooks, B. W., R. H. Robertson, C. L. Lutze-Wallace & W. Pfahler (2002). Monoclonal antibodies specific for Campylobacter fetus lipopolysaccharides. *Veterinary Microbiology*, 87, 37-49.
- Catita, D. (2013). Como escolher um touro para uma vacada? *Notícias Limousine*, p. 48 – 50.
- Campero, C.M., Anderson, M.L., Walker, R.L., Blanchard, P.C., Barbano, L., Chiu, P., Martínez, A., Combessies, G., Bardon, J.C. & Cordeviola, J. (2005). Immunohistochemical identification of Campylobacter fetus in natural cases of bovine and ovine abortions. *Journal of veterinary medicine. B, Infectious diseases and veterinary public health*, 52, 138 – 41.
- Chaban, B., Chu, S., Hendrick, S., Waldner, C. & Hill, J. E. (2012). Evaluation of a Campylobacter fetus subspecies venerealis real-time quantitative polymerase chain reaction for direct analysis of bovine preputial samples. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 76, 166 – 173.
- Cobo, E.R., Cipolla, A., Morsella, C., Cano, D. & Campero, C. (2003). Effect of two commercial vaccines to Campylobacter fetus subspecies on heifers naturally challenged. *Journal of veterinary medicine. B, Infectious diseases and veterinary public health*, 50, 75 – 80.

Cobo, E.R., Corbeil, L.B. & BonDurant, R.H. (2011). Immunity to infections in the lower genital tract of bulls. *Journal of Reproductive Immunology*, 89, 55 – 61.

Cobo, E.R., Morsella, C., Cano, D., Cipolla, A. & Campero, C.M. (2004). Immunization in heifers with dual vaccines containing *Tritrichomonas foetus* and *Campylobacter fetus* antigens using systemic and mucosal routes. *Theriogenology*, 62, 1367 – 1382.

Corbeil, L.B., Campero, C.M., Rhyan, J.C. & BonDurant, R.H. (2003). Vaccines against sexually transmitted diseases. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 1, 118.

Cortes, A. (2010). Maneio reprodutivo em bovinos de carne. Acedido em Agosto de 2013, disponível em: <http://www.clinicavetstoonofre.com/news/maneio-reprodutivo-em-bovinos-de-carne/>

Decreto-Lei nº 202/2005 de 24 de Novembro. *Diário da República nº 226 – I Série – A*. Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas. Lisboa.

Fanning, M., Selph, J., & Eubanks, S. (2012). Florida Cow-Calf Management, 2nd Edition - Managing Reproduction. Acedido em Agosto de 2013, disponível em: <http://edis.ifas.ufl.edu/pdf/AN/AN11900.pdf>

Figueiredo, J. F., Pellegrin, A. O., Fósculo, C. B., Machado, R. P., Miranda, K. L. & Lage, A. P. (2002). Evaluation of direct fluorescent antibody test for the diagnosis of bovine genital campylobacteriosis. *Revista latinoamericana de microbiología*, 44, 118 – 123.

Fósculo, C.B., Pellegrin, A.O., Stylen, A.P.R., Carneiro, R.L.R. & Lage, A.P. (2007). Uso terapêutico da vacinação contra a campilobacteriose genital bovina em touros do Pantanal. *Embrapa Pantanal: circular técnica*, 75. Acedido em Agosto, 2013, disponível em: <http://www.cpap.embrapa.br/publicacoes/online/CT75.pdf>

Givens, M. D. (2006). A clinical, evidence-based approach to infectious causes of infertility in beef cattle. *Theriogenology*, 66, p. 648 – 654.

Hakkinen, M., Heiska, H. & Hänninen, M. (2007). Prevalence of *Campylobacter spp.* in cattle in Finland and antimicrobial susceptibilities of bovine *Campylobacter jejuni* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 73 (10), 3232 – 3238.

Heuer, C., Sanhueza, J. & West, D. (2010). *Campylobacter fetus venerealis* in New Zealand beef breeding herds – myth or fact? [abstract] [versão electrónica]. In World Association for Buiatrics (Eds.), *Proceedings of the XXVI World Buiatrics Congress, Santiago de Chile, Chile*, 14 – 18 November. Acedido em Novembro, 2013, disponível em: <http://www.ivis.org/proceedings/wbc/2010/771.pdf>

Hum, S., Quinn, K., Brunner, J. & On, S.L. (1997). Evaluation of a PCR assay for identification and differentiation of *Campylobacter fetus* subspecies. *Australian Veterinary Journal*, 75, 827 – 31.

Hum, S., Stephens, L.R. & Quinn, C. (1991). Diagnosis by ELISA of bovine abortion due to *Campylobacter fetus*. *Australian Veterinary Journal*, 68, 272 – 275.

Hum, S. (2007). Vibriosis of cattle. Acedido em Agosto de 2013, disponível em: http://www.dpi.nsw.gov.au/data/assets/pdf_file/0009/110043/vibriosis-of-cattle.pdf

Inglis, G. D., Kalischuk, L. D. & Busz, H. W. (2004). Chronic shedding of *Campylobacter* species in beef cattle. *Journal of Applied Microbiology*, 97, 410 – 420.

Irons P.C., Schutte A.P., Van Der Walt M.L. & Bishop G.C. (2004) Genital campylobacteriosis in cattle. In Coetzer J.A.W. & Tustin R.C. (Eds), *Infectious Diseases of Livestock* (2nd ed). (pp. 1459 – 1468) Oxford University Press.

Instituto Nacional de Estatística (2013), *Estatísticas Agrícolas 2012*. Acedido em Setembro, 2013, disponível em: http://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_publicacoes&PUBLICACOESpub_boui=153380933&PUBLICACOESmodo=2

Irsik, M. B. & Shearer, J. K. (2010). Bovine Genital Campylobacteriosis. Acedido em Agosto, 2013, disponível em: <http://ufdc.ufl.edu/IR00003753/00001>

Jimenez, D.F., Perez, A.M., Carpenter, T.E. & Martinez A. (2011) Factors associated with infection by *Campylobacter fetus* in beef herds in the Province of Buenos Aires, Argentina. *Preventive Veterinary Medicine*, 101, 157 – 62.

Kelana, L.C. & Griffiths, M.W. (2003). Use of an autoluminescent *Campylobacter jejuni* to monitor cell survival as a function of temperature, pH, and sodium chloride. *Journal of Food Protection*, 11, 1964-2179.

Laboratorio Azul Diagnóstico S.A. (2012). 1.000.000 de Diagnósticos de Trichomonosis y Campylobacteriosis. *Revista Noticias - Grupo Laboratorios Azul*, p. 2.

Life Technologies Corporation (2012). *Real-time PCR handbook*. Acedido em Março, 2014, from Life Technologies™ website: http://find.lifetechnologies.com/Global/FileLib/qPCR/RealTimePCR_Handbook_Update_FLR.pdf

Lopes da Costa, L., Leitão Alegre, A. & Moraes Gradil, C. (1990). Gestão da fertilidade em efectivos bovinos leiteiros. *Medicina Veterinária*, nº 37, p. 39 – 46.

Lopes da Costa, L. (2008). Controlo da reprodução em efectivos bovinos de produção de carne. *Revista Portuguesa de Buiatria*, vol. 12 (nº 13), p. 5 – 14.

Lopes da Costa, L. (2011). Optimização reprodutiva de efectivos de bovinos de carne. Acedido em Agosto, 2013, disponível em: http://www.hvetmuralha.pt/uploads/cms/20110407150558_7.Optimizacao_reprodutiva_de_efectivos_de_bovinos_de_carne_em_extensivo_Prof._Dr._Luis_Lopes_da_Costa.pdf

Mai, H. M., Irons, P. C., Kabir, J. & Thompson, P. N. (2013). Prevalence of bovine genital campylobacteriosis and trichomonosis of bulls in northern Nigeria. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 55:56.

Matos, M. (2009). Controlo de 4 causas de infertilidade. Acedido em Agosto, 2013, disponível em: http://www.hvetmuralha.pt/uploads/cms/20090331073929_Controlo_de_4_causas_de_infertilidade-Dr_Miguel_Matos.pdf

McMillen, L., Fordyce, G., Doogan, V.J. & Lew, A.E. (2006). Comparison of culture and a novel 5' Taq nuclease assay for direct detection of *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* in clinical specimens from cattle. *Journal of Clinical Microbiology*, 44, 938 – 945.

Monke, H.J., Love, B.C., Wittum, T.E., Monke, D.R. & Byrum, B.A. (2002). Effect of transport enrichment medium, transport time, and growth medium on the detection of *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 14, 35 – 39.

Mshelia, G., Amin, J., Woldehiwet, Z., Murray, R. & Egwu, G. (2010). Epidemiology of Bovine Venereal Campylobacteriosis: Geographic Distribution and Recent Advances in Molecular Diagnostic Techniques. *Reproduction in Domestic Animals*, 4, 221 – 230.

Noakes, D. E., Parkinson, T. J. & England, G.C.W. (Eds.) (2001). *Arthur's Veterinary Reproduction and Obstetrics*. (8th ed.). United Kingdom: Elsevier.

On, S.L. & Harrington, C.S. (2001). Evaluation of numerical analysis of PFGE DNA profiles for differentiating *Campylobacter fetus* subspecies by comparison with phenotypic, PCR and 16S rDNA sequencing methods. *Journal of Applied Microbiology*, 90, 285 – 293.

Pellegrin, A. O., Figueiredo, J. F., Leite, R. C. & Lage, A. P. (2003) Imunofluorescência direta: um teste sensível e específico para o diagnóstico da Campilobacteriose genital em touros. *Embrapa Pantanal: Circular Técnica*, 44. Acedido em Agosto, 2013, disponível em: <http://www.cpap.embrapa.br/publicacoes/online/CT44.pdf>

Pfeiffer, D. U. (2002). *Veterinary Epidemiology - An Introduction*. Hertfordshire: Royal Veterinary College.

Preto, A. (2010). PlanParto – Programa de eficiência reprodutiva. *Notícias Limousine*, p. 57.

Preto, A. (2013). Compra de um touro: Regras para aquisição de reprodutores. *Notícias Limousine*, p. 94 – 96.

Riera, J. (2013). A alimentação de vacas em regime extensivo. *Ruminantes*, Ano 3 (nº 8), p. 16 – 18.

Robalo Silva, J. & Lopes da Costa, L. (2010). Avaliação da função reprodutiva do touro para sistemas de produção em extensivo: componentes da avaliação, protocolos e guia de interpretação. *Revista Portuguesa de Buiatria*, vol. 14 (nº 15), p. 39 – 54.

Rocha, A. & Carvalheira, J. (2002). Parâmetros reprodutivos e eficiência de inseminadores em explorações de bovinos de leite, em Portugal [versão eletrónica]. In Sociedade Portuguesa Ciências Veterinárias (Eds.), *Congresso Ciências Veterinárias 2002 Livro de Resumos*. Oeiras, Portugal, 10 – 12 de Outubro, p. 129 – 138. Acedido em Agosto, 2013, disponível em: <http://horta.0catch.com/congressospcv/12.pdf>

Roquete, C. (2008). Eficiência - Palavra-Chave em Sistemas de Produção de Bovinos de Carne. *Notícias Limousine*, p. 21.

Ruckerbauer, G. M., Malkin, K., Mitchell, D. & Boulanger, P. (1974). Vibriosis: Demonstration of *Vibrio fetus* and *Vibrio bubulus* organisms in preputial fluid by Immunofluorescence and cultural techniques. *Canadian Journal of Comparative Medicine*, 38, 321 – 327.

Schmidt, T., Venter, E.H. & Picard, J.A. (2010). Evaluation of PCR assays for the detection of *Campylobacter fetus* in bovine preputial scrapings and the identification of subspecies in South African field isolates. *Journal of the South African Veterinary Association*, 81, 87 – 92.

Schulze, F., Bagon, A., Müller, W. & Hotzel, H. (2006). Identification of *Campylobacter fetus* Subspecies by Phenotypic Differentiation and PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 44, 2019 – 2024.

Silva, R. (2012). O Touro de Monta Natural. *Notícias Limousine*, p. 74 – 75.

Smith, T. & Taylor, M. (1919). Some morphological and biological characters of the spirilla (*Vibrio fetus*, n. sp.) associated with disease of the fetal membranes in cattle. *The Journal of Experimental Medicine*, 30 (4), 299 – 311.

Tedesco, L.F., Errico, F. & Del Baglivi, L.P. (1977). Comparison of three sampling methods for the diagnosis of genital vibriosis in the bull. *Australian Veterinary Journal*, 53, 470 – 472.

Troxel, T.R. (2011). Real-life Implementation of Controlled Breeding Season [versão electrónica]. In Florida Beef Cattle Short Course, *Proceedings of the 60th Annual Florida Beef Cattle Short Course, Gainesville, United States of America, 4 – 6 May*, p. 47-52. Acedido em Agosto, 2013, disponível em: <http://www.animal.ifas.ufl.edu/extension/beef/BCSC/BCSC2011/documents/ftroxel.pdf>

Thrusfield, M. (2005). *Veterinary epidemiology* (3rd ed.). (pp. 471). Cornwall: Blackwell Science Ltd.

Vasquez, L.A., Ball, L., Bennett, B.W., Rupp, G.P., Ellis, R., Olson, J.D. & Huffman, M.H. (1983). Bovine genital campylobacteriosis (vibriosis): vaccination of experimentally infected bulls. *American Journal of Veterinary Research*, 44, 1553 – 1557.

Villa Nova, R. (2010). Maneio sanitário em explorações de carne. *Espaço Angus Magazine*, p. 62.

Walker, B. & McKinnon, B. (2011). Bovine Trichomoniasis. Acedido em Agosto, 2013, disponíveis em: http://www.dpi.nsw.gov.au/_data/assets/pdf_file/0011/409880/Bovine-trichomoniasis.pdf

Wagenaar, J. A. (2008). Bovine genital campylobacteriosis. In Office International des Épizooties, *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (mammals, birds and bees)* (7th ed.). (pp. 661 – 670). Paris: OIE.

Wagenaar, J. A., vanBergen, M. A. P., Newell, D. G., Grogono-Thomas, R. & Duim, B. (2001). Comparative study using amplified fragment length polymorphism fingerprinting, PCR genotyping, and phenotyping to differentiate *Campylobacter fetus* strains isolated from animals. *Journal of Clinical Microbiology*, 39 (6), 2283 – 2286.

Wesley, I. V., Wells, S. J., Harmon, K. M., Green, A., Schroeder-Tucker, L., Glover, M. & Siddique, I. (2000). Fecal shedding of *Campylobacter* and *Arcobacter* spp. in dairy cattle. *Applied and Environmental Microbiology*, 66 (5), 1994 – 2000.

Willoughby, K., Nettleton, P.F., Quirie, M., Maley, M.A., Foster, G., Toszeghy, M. & Newell, D. G. (2005). A multiplex polymerase chain reaction to detect and differentiate *Campylobacter fetus* subspecies *fetus* and *Campylobacter fetus* –species *venerealis*: use on UK isolates of *C. fetus* and other *Campylobacter* spp. *Journal of Applied Microbiology*, 99, 758 – 766.

Winter, A. J., Samuelson, J. D., Elkana, M. A. (1967). A comparison of immunofluorescence and cultural techniques for demonstration of *Vibriosis fetus*. *Journal of American Veterinary Medicine Association*, 150 (8), 498 – 502.

Yaeger, M. J. & Hollery, L. D. (2007). Bacterial Causes of Bovine Infertility and Abortion. In R. S. Youngquist & W. R. Threlfall (Eds), *Current Therapy in Large Animal Theriogenology*, (2nd ed.). (pp. 391 – 393). Elsevier.

8. ANEXOS

8.1. Anexo 1. Inquérito realizado aos criadores durante a visita às explorações.

(páginas 61 e 62)

**PESQUISA DE *CAMPYLOBACTER FETUS* E *TRITRICHOMONAS FOETUS*
- INQUÉRITO EPIDEMIOLÓGICO**

Dados da exploração

Data ____/____/____

Proprietário

Exploração

ID da exploração

Coordenadas

Contacto

Anamnese

1. Existem explorações vizinhas? ☐ Sim ☐ Não
 2. Houve entrada de animais na sua exploração acidentalmente (por exemplo, vedações partidas)? ☐ Sim ☐ Não
 3. Troca ou faculta touros a outras explorações? ☐ Sim ☐ Não
 4. Quando adquire animais, eles fazem quarentena? ☐ Sim ☐ Não
- Dias ____

Efetivo total	Vacas adultas	Touros	Novilhas
Número			

Maneio da exploração

1. A sua vacada está disposta por lotes? Como é que os organiza?

Saneamento

Data do último saneamento	Classificação sanitária	Profilaxia	
		Vacina / Frequência	Desparasitação
____/____/____	B __ T __ L __		

1. Existe alguma história de doença reprodutiva nesta exploração?

☐ Não ☐ Sim Qual? _____

Parâmetros reprodutivos

Época de reprodução (S/N) _____ Se respondeu **SIM**, quantas? _____
Se respondeu **NÃO**, faz regimes de alternância
com os seus touros (S/N)? _____

Método Reprodutivo

☐ Cobrição natural ☐ IA ☐ IA + toiro de limpeza

Efetivo reprodutor

Nº partos por ano na vacada	
Idade média à 1ª cobrição	
Idade média ao 1º parto	
Idade média do touro 1ª à cobrição	
Idade média do touro que cobre as novilhas	
IEP	
Distribuição dos partos (quinzena/mês)	

Diagnóstico de gestação

☐ Não ☐ Sim ☐ Palpação ☐ ECO
☐ 35 dias ☐ Confirmação

TAXA	Valor	Observações	
Fertilidade anual			
Substituição (por causas reprodutivas)			
Aborto		Tempo gestação	Aspecto
Retenção placentária			
Endometrites/metrites			
Piómetras			
Repetição de cios			

8.2. Anexo 2. Ficha de registo de acompanhamento do EA elaborada pelo HVME.

(páginas 64 e 65)

Exame Andrológico Animal N° _____

Avaliação da condição corporal

1 ☐ 1,5 ☐ 2 ☐ 2,5 ☐ 3 ☐ 3,5 ☐ 4 ☐ 4,5 ☐ 5 ☐

Exame do Tracto Genital

Pénis e Prepúcio

Exteriorização do pénis: Sim ☐ Não ☐

Integridade do prepúcio: Sim ☐ Não ☐ Obs: _____

Integridade do pénis: Sim ☐ Não ☐ Obs: _____

Escroto

Integridade do Escroto: Sim ☐ Não ☐ (Feridas ☐ / Parasitas ☐ / Outra ☐)

Obs: _____

Perímetro Escrotal: _____ cm

Idade (meses)	Classificação			
	Muito Bom	Bom	Satisfatório	Mau
12 a 14	>34	30 – 34	30	< 30
15 a 20	>36	31 – 36	31	< 31
21 a 30	>38	32 – 38	32	< 32
> 31	>39	34 – 39	34	< 34

Inflamações: Epididimite ☐ / Balanostite ☐ / Balanopostite ☐ / Postite ☐

Espermograma

Ejaculação: Sim ☐ Não ☐ Dolorosa: Sim ☐ Não ☐ Obs: _____

Foi obtida uma amostra por electroejaculação (Electrojav V) de _____ ciclos.

1. Avaliação Macroscópica

Volume: _____ ml

Viscosidade: Aquoso ☐ Seroso ☐ Leitoso ☐ Cremoso ☐

Densidade: Muito opáco ☐ Opáco ☐ Translúcida ☐

Concentração:

Clas.	Descrição	Aspecto do Sêmen	N° de SPZ/mm ³
DD	Sêmen densíssimo	Muito Cremoso	8 x10 ⁹
D	Sêmen denso	Cremoso	6 - 8 x10 ⁹
SD	Sêmen semi-denso	Leitoso	4 - 6 x10 ⁹
R	Sêmen ralo	Seroso	< 4 x10 ⁹
RR	Sêmen muito ralo	Seroso e Translúcido	< 2 x10 ⁹
A	"Dribling"	Aquoso e Incolor (água)	Azoospermia

Coloração: Incolor ☐ Translúcido ☐ Branco ☐ Creme ☐ Outra ☐ (Qual? _____)

Cheiro: Inodoro ☐ Odor ☐ pH: _____ Não avaliado ☐ Neutro ☐ Alcalino ☐

2. Avaliação Microscópica

Mobilidade Massal:

Class.	Descrição
Muito Bom	Turbilhões intensos com ondas rápidas em ómega tipo movimento de chicote
Bom	Rápidos movimentos de onda com onda distinta que atinge a periferia da gota
Satisfatório	Lentos movimentos de onda que não atinge a periferia da gota
Mediocre	Movimento generalizado com ligeiras correntes ondulatórias e sem uma onda evidente
Mau	Ausência de oscilação ou oscilação esporádica

Mobilidade Individual Espermatozóides com mobilidade progressiva: _____%

Movimentos anormais: Circulares ☐ /Oscilatórios ☐ /Lateralidade ☐/Retro-flexão ☐

Classificação	Avaliação descritiva	
Muito Bom	80 – 100% de SPZ com movimentos progressivos rectilíneos e rápidos	
	80 – 100% de SPZ mas alguns com movimentos anormais	
Bom	60 – 80% de SPZ com movimentos progressivos (Rectilíneos e moderados)	
	60 – 80% de SPZ mas alguns com movimentos anormais	
Satisfatório	40 – 60% de SPZ com movimentos progressivos (Rectilíneos e lentos)	
	40 – 60% de SPZ mas alguns com movimentos anormais	
Mediocre	10 – 40% de SPZ com movimentos progressivos (Erráticos, muito lentos)	
	Menos de 10% de movimentos progressivos ou só mobilidade anormal	
Mau	Imobilidade dos SPZ	

Formas Anormais

Incidência: _____ %

Tipo:

Cabeças	Pecas Intermediárias	Caudas
Micro <input type="checkbox"/> / Macro <input type="checkbox"/> / Alongadas <input type="checkbox"/> / Duplas <input type="checkbox"/>	Implatação lateral <input type="checkbox"/>	Enrolamento <input type="checkbox"/>
Piriformes <input type="checkbox"/> / Decapitação <input type="checkbox"/> / Destacamento <input type="checkbox"/>	Flexão <input type="checkbox"/> / Ruptura <input type="checkbox"/>	(c/ Gota citoplasmática <input type="checkbox"/>)
<u>Acrossoma:</u>	<u>Gota Citoplasmática:</u>	Secção <input type="checkbox"/> / Dobradas <input type="checkbox"/>
Globoloso <input type="checkbox"/> / Incompleto <input type="checkbox"/>	Distal <input type="checkbox"/> / Proximal <input type="checkbox"/>	Curvatura em U <input type="checkbox"/> / Curta <input type="checkbox"/>
Deslocamento Total <input type="checkbox"/> / Parcial <input type="checkbox"/>	Degenerada <input type="checkbox"/>	Retroflexão <input type="checkbox"/> / Duplas <input type="checkbox"/>
Outras <input type="checkbox"/> Quais? _____		

_____ % Primárias _____ % Secundárias

Classificação	Muito Bom	Bom	Satisfatório	Mau
Primárias	< 10%	10% – 19%	20% – 29%	> 29%
Totais	< 25%	26% – 39%	40% – 59%	> 59%

Outras Células

Células inflamatórias: Sim ☐ Não ☐

Células de descamação: Sim ☐ Não ☐

Outras ☐ (Quais? _____)

